Este texto constitui um instrumento de documentação e não tem qualquer efeito jurídico. As Instituições da União não assumem qualquer responsabilidade pelo respetivo conteúdo. As versões dos atos relevantes que fazem fé, incluindo os respetivos preâmbulos, são as publicadas no Jornal Oficial da União Europeia e encontram-se disponíveis no EUR-Lex. É possível aceder diretamente a esses textos oficiais através das ligações incluídas no presente documento

►B

REGULAMENTO (CE) N.º 440/2008 DA COMISSÃO

de 30 de Maio de 2008

que estabelece métodos de ensaio nos termos do Regulamento (CE) n.º 1907/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho relativo ao registo, avaliação, autorização e restrição de substâncias químicas (REACH)

(Texto relevante para efeitos do EEE)

(JO L 142 de 31.5.2008, p. 1)

Alterado por:

		Jornal Oficial		
		n.º	página	data
►M1	Regulamento (CE) n.º 761/2009 da Comissão de 23 de Julho de 2009	L 220	1	24.8.2009
►M2	Regulamento (UE) n.º 1152/2010 da Comissão de 8 de Dezembro de 2010	L 324	13	9.12.2010
►M3	Regulamento (UE) n.º 640/2012 da Comissão de 6 de julho de 2012	L 193	1	20.7.2012
►M4	Regulamento (UE) n.º 260/2014 da Comissão de 24 de janeiro de 2014	L 81	1	19.3.2014
►M5	Regulamento (UE) n.º 900/2014 da Comissão de 15 de julho de 2014	L 247	1	21.8.2014
►M6	Regulamento (UE) 2016/266 da Comissão de 7 de dezembro de 2015	L 54	1	1.3.2016
►M7	Regulamento (UE) 2017/735 da Comissão de 14 de fevereiro de 2017	L 112	1	28.4.2017
►M8	Regulamento (UE) 2019/1390 da Comissão de 31 de julho de 2019	L 247	1	26.9.2019

▼B

REGULAMENTO (CE) N.º 440/2008 DA COMISSÃO

de 30 de Maio de 2008

que estabelece métodos de ensaio nos termos do Regulamento (CE) n.º 1907/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho relativo ao registo, avaliação, autorização e restrição de substâncias químicas (REACH)

(Texto relevante para efeitos do EEE)

Artigo 1.º

Os métodos de ensaio a aplicar para os fins do Regulamento (CE) n.º 1907/2006 são os estabelecidos no anexo do presente regulamento.

Artigo 2.º

A Comissão reexaminará, quando pertinente, os métodos de ensaio constantes do presente regulamento, com o objectivo de substituir, reduzir ou aperfeiçoar os ensaios com vertebrados.

Artigo 3.º

Todas as referências ao anexo V da Directiva 67/548/CEE devem entender-se como referências ao presente regulamento.

Artigo 4.º

O presente regulamento entra em vigor no dia seguinte ao da sua publicação no *Jornal Oficial da União Europeia*.

É aplicável a partir de 1 de Junho de 2008.

▼B

ANEXO

▼M6

Nota:

Antes de utilizar um dos seguintes métodos de ensaio para testar uma substância multicomponentes (SMC), uma substância de composição desconhecida ou variável, produto de reação complexo ou matéria biológica (DVCB) ou uma mistura, caso o método de ensaio em causa não especifique a sua aplicabilidade ao ensaio de SMC, DVCB ou misturas, deve ponderar-se se o mesmo é adequado à finalidade regulamentar pretendida.

Se o método de ensaio for utilizado para testar uma SMC, DVCB ou mistura, devem fornecer-se dados suficientes sobre a composição desta, nomeadamente a identidade química dos seus componentes, a ocorrência quantitativa destes e as principais propriedades dos componentes.

▼B

PARTE A: MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

ÍNDICE

A.1. TEMPERATURA DE FUSÃO/CONGELAÇÃO

A.2. TEMPERATURA DE EBULIÇÃO

A.3. DENSIDADE RELATIVA

A.4. PRESSÃO DE VAPOR

A.5. TENSÃO SUPERFICIAL

A.6. SOLUBILIDADE EM ÁGUA

A.8. COEFICIENTE DE PARTIÇÃO

A.9. PONTO DE INFLAMAÇÃO

A.10. INFLAMABILIDADE (SÓLIDOS)

A.11. INFLAMABILIDADE (GASES)

A.12. INFLAMABILIDADE (CONTACTO COM ÁGUA)

A.13. PROPRIEDADES PIROFÓRICAS DE SÓLIDOS E LÍQUIDOS

A.14. PROPRIEDADES EXPLOSIVAS

A.15. TEMPERATURA DE AUTO-IGNIÇÃO (LÍQUIDOS E GASES)

A.16. TEMPERATURA DE AUTO-IGNIÇÃO RELATIVA PARA OS SÓLIDOS

A.17. PROPRIEDADES OXIDANTES (SÓLIDOS)

A.18. MASSA MOLECULAR MÉDIA EM FUNÇÃO DO NÚMERO DE MOLES E DISTRIBUIÇÃO DA MASSA MOLECULAR EM POLÍMEROS

A.19. TEOR EM POLÍMEROS DE BAIXA MASSA MOLECULAR

A.20. COMPORTAMENTO DOS POLÍMEROS DA DISSOLUÇÃO/EXTRACÇÃO AQUOSA

A.21. PROPRIEDADES DE COMBURÊNCIA (LÍQUIDOS)

A.22. DIÂMETRO MÉDIO GEOMÉTRICO PONDERADO EM FUNÇÃO DO COMPRIMENTO DE FIBRAS

A.23. COEFICIENTE DE PARTIÇÃO (1-OCTANOL/ÁGUA): MÉTODO DE AGITAÇÃO LENTA

A.24. COEFICIENTE DE PARTIÇÃO (*N*-OCTANOL/ÁGUA): MÉTODO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)

A.25. CONSTANTES DE DISSOCIAÇÃO EM ÁGUA (MÉTODO DE TITULAÇÃO — MÉTODO ESPETROFOTOMÉTRICO — MÉTODO CONDUTIMÉTRICO)

▼B

A.1. TEMPERATURA DE FUSÃO/CONGELAÇÃO

1. MÉTODO

A maior parte dos métodos descritos baseiam-se na publicação «OECD Test Guideline» (1) (normas de procedimento para testes da OCDE). Os princípios fundamentais encontram-se descritos nas referências (2) e (3).

1.1. INTRODUÇÃO

Os métodos e dispositivos descritos destinam-se a ser aplicados à determinação da temperatura de fusão de substâncias, sem quaisquer restrições no que diz respeito ao seu grau de pureza.

A selecção do método depende da natureza da substância que se pretende testar. Em consequência, o factor limitativo dependerá do facto de a substância poder ser ou não ser facilmente pulverizada, pulverizada com dificuldade, ou não poder ser mesmo pulverizada.

Para algumas substâncias considera-se mais apropriado a determinação da temperatura de congelação ou de solidificação, tendo as normas para estas determinações sido englobadas também neste método.

No caso de não se poder medir convenientemente nenhum dos parâmetros anteriores devido à existência de propriedades particulares da substância, recomenda-se a determinação de um ponto de fluidez.

1.2. DEFINIÇÕES E UNIDADES

Define-se a temperatura de fusão como sendo a temperatura à qual ocorre a transição de fase do estado sólido para o estado líquido à pressão atmosférica, correspondendo idealmente essa temperatura à temperatura de fusão.

Uma vez que a transição de fase de diversas substâncias ocorre num intervalo de temperaturas, associa-se-lhe frequentemente um intervalo de fusão.

Conversão de unidades (K para ^{o}C)

$t = T - 273{,}15$

t: temperatura de Celsius, graus Celsius (^{o}C)

T: temperatura termodinâmica, Kelvin (K)

1.3. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNC1A

Não é necessário utilizar substâncias de referência quando se está a investigar uma nova substância. Essas substâncias servem essencialmente para verificar, de vez em quando, as características de execução do método e para proporcionar a comparação com resultados obtidos com outros métodos.

Na referência (4) encontram-se enumeradas algumas substâncias de calibração.

▼B

1.4. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

Determina-se a temperatura (intervalo de temperaturas) da transição de fase do estado sólido para o estado líquido ou do estado líquido para o estado sólido. Na prática, enquanto se aquece/arrefece uma amostra da substância ensaiada à pressão atmosférica, determina-se as temperaturas da fase inicial de fusão/congelação e da fase final de fusão/congelação. Descrevem-se cinco tipos de métodos, designadamente o método capilar, os métodos das fases quentes, as determinações da temperatura de congelação, os métodos de análise térmica e a determinação do ponto de fluidez (desenvolvido para os derivados oleosos do petróleo).

Em alguns casos pode ser conveniente medir a temperatura de congelação em vez de se medir a temperatura de fusão.

1.4.1. **Método capilar**

1.4.1.1. *Dispositivos para a determinação da temperatura de fusão, com banho líquido*

Coloca-se uma pequena quantidade da substância finamente triturada num tubo capilar e compacta-se fortemente. Aquece-se o tubo em simultâneo com um termómetro e ajusta-se a subida de temperatura para um valor inferior a 1 K/min durante a fusão efectiva. Determinam-se as temperaturas de fusão inicial e final.

1.4.1.2. *Dispositivos para a determinação da temperatura de fusão, com bloco metálico*

Conforme descrito em 1.4.1.1, com a excepção de o tubo capilar e o termómetro estarem num bloco metálico aquecido e poderem ser observados através de aberturas existentes no bloco.

1.4.1.3. *Detecção por célula fotoeléctrica*

A amostra no tubo capilar é aquecida automaticamente num cilindro metálico. Dirige-se um feixe de luz através da substância, passando por uma abertura existente no cilindro, de modo a atingir uma célula fotoeléctrica calibrada com precisão. Quando da fusão, as propriedades ópticas da maior parte das substâncias variam de opacas para transparentes. A intensidade da luz que atinge a célula fotoeléctrica aumenta e envia um sinal de paragem para o indicador digital, que procede à leitura da temperatura de um termómetro de resistência de platina localizado na câmara de aquecimento. Este método não é adequado para algumas substâncias fortemente coradas.

1.4.2. **Fases quentes**

1.4.2.1. *Barra quente de Kofler*

O método da barra quente de Kofler utiliza duas peças metálicas de condutividade térmica diferente, aquecidas electricamente, sendo a barra concebida de tal modo que o gradiente de temperatura é quase linear segundo o seu comprimento. A temperatura da barra quente pode variar desde 283 até 573 K, existindo um dispositivo especial de leitura da temperatura constituído por um cursor com um ponteiro e uma escala, concebidos especificamente para a barra. No sentido de se determinar uma temperatura de fusão, espalha-se a substância em camada fina directamente sobre a superfície da barra quente. Decorridos alguns segundos surge uma linha que separa as fases fluida e sólida. Lê-se a temperatura nesta linha ajustando o ponteiro sobre ela.

▼B

1.4.2.2. *Microscópio de fusão*

Existem diferentes tipos de microscópios de placas quentes para a determinação das temperaturas de fusão, utilizando-se quantidades muito pequenas de material. Na maior parte dos aparelhos mede-se a temperatura com um termopar sensível mas, por vezes, utilizam-se termómetros de mercúrio. Existe um equipamento típico para a medição da temperatura de fusão pelo método das placas quentes utilizando microscópio, o qual possui uma câmara de aquecimento contendo uma placa metálica, sobre a qual se coloca a amostra numa lâmina. O centro da placa metálica contém um orifício que permite a entrada de luz proveniente do espelho de iluminação do microscópio. Durante a utilização o compartimento é fechado com uma placa de vidro para eliminar o ar da zona da amostra.

O aquecimento da amostra é regulado com um reóstato. Para as medições de elevada precisão das substâncias opticamente anisotrópicas, pode utilizar-se luz polarizada.

1.4.2.3. *Método do menisco*

Este método é utilizado especificamente para as poliamidas.

A temperatura à qual ocorre o deslocamento de um menisco de óleo de silicone, encerrado entre uma placa quente e um vidro de cobertura da amostra de poliamida testada, é determinada visualmente.

1.4.3. **Método para determinar a temperatura de congelação**

Coloca-se a amostra num tubo de ensaio especial e leva-se a um aparelho para a determinação da temperatura de congelação. Agita-se a amostra suave e continuamente durante o arrefecimento e mede-se a temperatura em intervalos adequados. Logo que a temperatura permaneça constante durante algumas leituras considera-se que esse valor (corrigido em função do erro do termómetro) é a temperatura de congelação.

Deve evitar-se o sobrearrefecimento, mantendo-se o equilíbrio entre as fases sólida e líquida.

1.4.4. **Análise térmica**

1.4.4.1. *Análise térmica diferencial (ATD)*

Esta técnica regista a diferença de temperaturas existente entre a substância e um material de referência em função da temperatura, enquanto a substância e o material de referência são submetidos ao mesmo programa de temperatura controlada. Quando a amostra sofre uma transição que implica uma variação de entalpia, essa variação é indicada por um afastamento endotérmico (fusão) ou exotérmico (congelação), relativamente à linha de referência do registo de temperatura.

▼B

1.4.4.2. *Calorimetria de exploração diferencial (CED)*

Esta técnica regista a diferença entre a absorção de energia por uma substância e por um material de referência em função da temperatura, enquanto a substância e o material de referência são submetidos ao mesmo programa de temperatura controlada. Essa energia é a necessária para estabelecer uma diferença nula de temperatura entre a substância e o material de referência. Quando a amostra sofre uma transição que implica uma variação de entalpia, essa variação é indicada por um afastamento endotérmico (fusão) ou exotérmico (congelação), relativamente à linha de referência do registo de fluxo de calor.

1.4.5. **Ponto de fluidez**

Este método foi desenvolvido para ser utilizado com os derivados oleosos do petróleo e é adequado para utilização apenas com substâncias de baixas temperaturas de fusão.

Após um aquecimento preliminar procede-se ao arrefecimento da amostra segundo um regime específico e faz-se a observação das suas características de fluidez em intervalos de 3 K. A temperatura mais baixa para a qual se observa movimento da substância é considerada como ponto de fluidez.

1.5. CRITÉRIOS DE QUALIDADE

A aplicabilidade e a precisão dos diversos métodos utilizados para a determinação da temperatura de fusão/intervalo de fusão encontram-se resumidas no quadro seguinte:

QUADRO: APLICABILIDADE DOS MÉTODOS

A. **Métodos capilares**

Método de medição	Substâncias que podem ser pulverizadas	Substâncias dificilmente pulverizadas	Intervalo de temperaturas	Precisão estimada [1]	Norma existente
Dispositivos com banho líquido	Sim	Só para algumas	273 a 573 K	± 0,3 K	JIS K 0064
Dispositivos com bloco metálico	Sim	Só para algumas	293 a > 573 K	± 0,5 K	ISO 1218 (E)
Detecção por célula fotoeléctrica	Sim	Diversas com dispositivos de aplicação	253 a 573 K	± 0,5 K	

[1] Dependente do tipo de instrumento e do grau de pureza da substância.

▼B

B. **Métodos das fases quentes e de congelação**

Método de medição	Substâncias que podem ser pulverizadas	Substâncias dificilmente pulverizadas	Intervalo de temperaturas	Precisão estimada (1)	Norma existente
Barra quente de Kofler	Sim	Não	283 a > 573 K	± 1,0 K	ANSI/ASTM D 3451-76
Microscópio de fusão	Sim	Só para algumas	273 a > 573 K	± 0,5 K	DIN 53736
Método do menisco	Não	Especificamente para poliamidas	293 a > 573 K	± 0,5 K	ISO 1218 (E)
Métodos da temperatura de congelação	Sim	Sim	223 a 573 K	± 0,5 K	por ex., BS 4695

(1) Dependente do tipo de instrumento e do grau de pureza da substância.

C. **Análise térmica**

Método de medição	Substâncias que podem ser pulverizadas	Substâncias dificilmente pulverizadas	Intervalo de temperaturas	Precisão estimada (1)	Norma existente
Análise térmica diferencial	Sim	Sim	173 a 1 273 K	até 600 K ± 0,5 K até 1 273 K ± 2,0 K	ASTM E 537-76
Calorimetria de exploração diferencial	Sim	Sim	173 a 1 273 K	até 600 K ± 0,5 K até 1 273 K ± 2,0 K	ASTM E 537-76

(1) Dependente do tipo de instrumento e do grau de pureza da substância.

D. **Ponto de fluidez**

Método de medição	Substâncias que podem ser pulverizadas	Substâncias dificilmente pulverizadas	Intervalo de temperaturas	Precisão estimada (1)	Norma existente
Ponto de fluidez	Para derivados oleosos do petróleo e para substâncias oleosas	Para derivados oleosos do petróleo e para substâncias oleosas	223 a 323 K	± 3,0 K	ASTM D 97-66

(1) Dependente do tipo de instrumento e do grau de pureza da substância.

1.6. DESCRIÇÃO DOS MÉTODOS

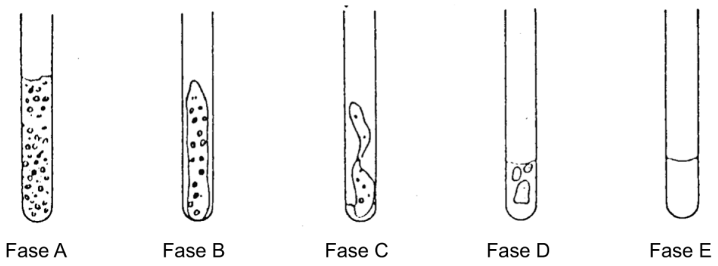
Os procedimentos de quase todos os métodos de ensaio encontram-se descritos em normas internacionais e nacionais (ver apêndice 1).

1.6.1. **Métodos com tubo capilar**

Quando submetidas a uma lenta subida de temperatura, as substâncias finamente pulverizadas apresentam normalmente as fases de fusão representadas na figura 1.

▼B

Figura 1



Fase A (início da fusão): gotículas finas aderem uniformemente à parede interior do tubo capilar.

Fase B aparece um espaço livre entre a amostra e a parede interior devido à contracção da substância fundida.

Fase C a amostra contraída inicia a queda sobre o fundo e liquefaz-se.

Fase D forma-se um menisco completo à superfície mas uma quantidade apreciável da amostra permanece sólida.

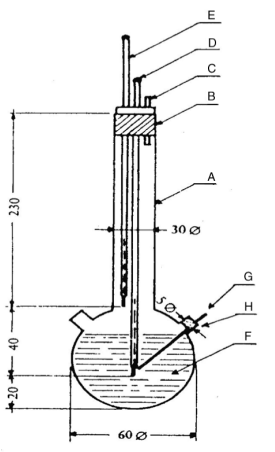
Fase E (fase final da fusão): não existem quaisquer partículas sólidas.

Durante a determinação da temperatura de fusão procede-se ao registo das temperaturas da fase inicial da fusão e da fase final.

1.6.1.1. *Dispositivos para a determinação da temperatura de fusão com aparelho de banho líquido*

A figura 2 representa um tipo de aparelho normalizado para a determinação da temperatura de fusão, feito de vidro (JIS K 0064); todas as especificações são dadas em milímetros.

Figura 2



A: recipiente de medição
B: rolha
C: ventilador
D: termómetro
E: termómetro auxiliar
F: banho líquido
G: tubo capilar de vidro, de 80 a 100 mm de comprimento, 1,0 ± 0,2 mm de diâmetro interno, 0,2 a 0,3 mm de espessura da parede
H: tubo lateral

▼B

Líquido do banho:

Deve escolher-se um líquido adequado. A escolha do líquido depende da temperatura de fusão que se pretende determinar; por exemplo, escolher-se-á parafina líquida para temperaturas de fusão não superiores a 473 K, óleo de silicone para temperaturas de fusão não superiores a 573 K.

Para temperaturas superiores a 523 K pode utilizar-se uma mistura constituída por três partes de ácido sulfúrico e por duas partes de sulfato de potássio (em peso). Deverão ser tomadas precauções adequadas no caso de se utilizar uma mistura deste tipo.

Termómetro

Apenas deverão ser utilizados termómetros que satisfaçam as exigências das normas indicadas a seguir ou critérios equivalentes:

ASTM E 1-71, DIN 12770, JIS K 8001.

Procedimento:

Pulveriza-se finamente a substância seca utilizando um almofariz e coloca-se no interior do tubo capilar, selado numa das extremidades, de tal modo que a altura do enchimento seja aproximadamente 3 mm após boa compactação. Para se obter uma amostra compacta uniforme o tubo capilar deverá cair verticalmente de uma altura de aproximadamente 700 mm através de um tubo de vidro e sobre um vidro de relógio.

Depois de cheio coloca-se o tubo capilar no banho, de tal modo que a parte média da ampola de mercúrio do termómetro toque no tubo capilar na parte onde se encontra a amostra. Normalmente o tubo capilar é introduzido no aparelho a uma temperatura cerca de 10 K inferior à temperatura de fusão.

Aquece-se o líquido do banho de tal modo que o aumento da temperatura seja aproximadamente 3 K/min. O líquido deverá ser agitado. Quando se atingir uma temperatura cerca de 10 K inferior à temperatura de fusão esperada, ajusta-se a subida da temperatura para um valor máximo de 1 K/min.

Cálculo:

O cálculo da temperatura de fusão efectua-se do modo seguinte:

$T = T_D + 0{,}00016\ (T_D - T_E)\ n$

em que:

T = temperatura de fusão corrigida, em K;

T_D = leitura da temperatura no termómetro D, em K;

T_E = leitura da temperatura no termómetro E, em K;

n = número de graduações na linha do mercúrio no termómetro D na parte emergente da haste.

1.6.1.2. *Dispositivos para a determinação da temperatura de fusão, com bloco metálico*

Aparelho:

Este é constituído por:

— um bloco metálico cilíndrico, cuja parte superior é oca e forma um compartimento (ver figura 3),

— uma tampa metálica, com duas ou várias aberturas, para permitir a montagem de tubos no bloco metálico,

▼B

— um sistema de aquecimento para o bloco metálico, que pode ser, por exemplo, uma resistência eléctrica encerrada no bloco,

— um reóstato para regular a potência de entrada no caso de se utilizar aquecimento eléctrico,

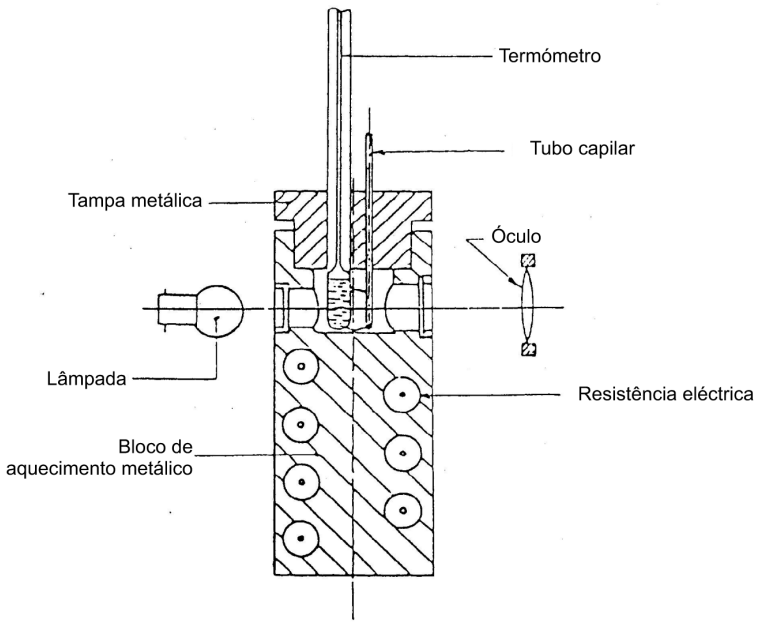
— quatro janelas de vidro resistente ao calor situadas nas paredes laterais do compartimento, dispostas diametralmente segundo ângulos rectos relativamente umas às outras. Em frente de uma destas janelas monta-se um óculo para observação do tubo capilar. As outras três janelas são utilizadas para iluminar o interior do compartimento, por meio de lâmpadas,

— um tubo capilar, em vidro resistente ao calor e fechado numa extremidade (ver 1.6.1.1).

Termómetro

Ver as normas referidas em 1.6.1.1. Também se podem utilizar dispositivos de medição termoeléctrica, de precisão equivalente.

Figura 3



1.6.1.3. *Detecção por célula fotoeléctrica*

Aparelho e procedimento:

O aparelho é constituído por um compartimento metálico com um sistema de aquecimento automático. Procede-se ao enchimento de três tubos capilares conforme descrito em 1.6.1.1, os quais são depois colocados na estufa.

▼B

Utilizam-se várias variações lineares de temperatura para calibrar o aparelho e ajusta-se electricamente o aumento de temperatura adequado, segundo uma razão linear e constante pré-seleccionada. Os registadores mostram a temperatura efectiva da estufa e a temperatura da substância nos tubos capilares.

1.6.2. **Fases quentes**

1.6.2.1. *Barra quente de Kofler*

Ver apêndice.

1.6.2.2. *Microscópio de fusão*

Ver apêndice.

1.6.2.3. *Método do menisco (poliamidas)*

Ver apêndice.

O esquema gradual de aquecimento próximo da temperatura de fusão deverá ser inferior a 1 K/min.

1.6.3. **Métodos para a determinação da temperatura de congelação**

Ver apêndice.

1.6.4. **Análise térmica**

1.6.4.1. *Análise térmica diferencial*

Ver apêndice.

1.6.4.2. *Calorimetria de exploração diferencial*

Ver apêndice.

1.6.5. **Determinação do ponto de fluidez**

Ver apêndice.

2. **RESULTADOS**

Em alguns casos é necessário efectuar uma correcção devida ao termómetro.

3. **RELATÓRIO**

O relatório do ensaio deverá conter, se possível, a informação seguinte:

— método utilizado,

— especificação exacta da substância (identificação e impurezas) e fases de purificação prévias no caso de existirem,

— uma estimativa da precisão.

Considera-se como temperatura de fusão a média de peio menos duas medições efectuadas no intervalo de precisão estimado (ver quadros).

▼B

Se a diferença entre a temperatura na fase inicial e a temperatura na fase final da fusão estiver entre os limites de precisão do método, considera-se como temperatura de fusão o valor observado na fase final da fusão; caso contrário serão indicadas as duas temperaturas.

No caso de a substância se decompor ou sublimar antes de atingir a temperatura de fusão, indicar-se-á a temperatura para a qual se observa esse efeito.

Todas as informações e notas relevantes para a interpretação dos resultados deverão ser descritas, especialmente no que diz respeito às impurezas e ao estado físico da substância.

4. **REFERÊNCIAS**

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 102, Decision of the Council C(81) 30 final.

(2) IUPAC, B. Le Neindre, B. Vodar, eds. Experimental thermodynamics, Butterworths, London 1975, vol. II, p. 803-834.

(3) R. Weissberger ed.: Technique of organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Interscience Publ., New York, 1959, vol. I, Part I, Chapter VII.

(4) IUPAC, Physicochemical measurements: Catalogue of reference materials from national laboratories, Pure and applied chemistry, 1976, vol. 48, p. 505-515.

▼B

Apêndice

Para pormenores técnicos adicionais é possível consultar, por exemplo, as normas seguintes:

1. **Métodos capilares**

1.1. Dispositivos de medição da temperatura de fusão com banho líquido

ASTM E 324-69	Standard test method for relative initial and final melting points and the melting range of organic chemicals
BS 4634	Method for the determination of melting point and/or melting range
DIN 53181	Bestimmung des Schmelzintervalles von Harzen nach Kapillarverfahren
JIS K 00-64	Testing methods for melting point of chemical products

1.2. Dispositivos para a determinação da temperatura de fusão com bloco metálico

DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen
ISO 1218 (E)	Plastics — polyamides — determination of «melting point»

2. **Fases quentes**

2.1. Barra quente de Kofler

ANSI/ASTM D 3451-76	Standard recommended practices for testing polymeric power coatings

2.2. Microscópio de fusão

DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen.

2.3. Método do menisco (poliamidas)

ISO 1218 (E)	Plastics — polyamides — determination of «melting point»

▼B

ANSI/ASTM D 2133-66	Standard specification for acetal resin injection moulding and extrusion materials
NF T 51-050	Résines de polyamides. Détermination du «point de fusion». Méthode du ménisque

3. **Métodos para a determinação da temperatura de congelação**

BS 4633	Method for the determination of crystallizing point
BS 4695	Method for Determination of Melting Point of Petroleum Wax (cooling curve)
DIN 51421	Bestimmung des Gefrierpunktes von Flugkraftstoffen, Ottokraftstoffen und Motorenbenzolen
ISO 2207	Cires de pétrole: détermination de la température de figeage
DIN 53175	Bestimmung des Erstarrungspunktes von Fettsäuren
NF T 60-114	Point de fusion des paraffines
NF T 20-051	Méthode de détermination du point de cristallisation (point de congélation)
ISO 1392	Method for the determination of the freezing point

4. **Análise térmica**

4.1. Análise térmica diferencial

ASTM E 537-76	Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis
ASTM E 473-85	Standard definitions of terms relating to thermal analysis

▼B

ASTM E 472-86	Standard practice for reporting thermoanalytical data
DIN 51005	Thermische Analyse, Begriffe

4.2. Calorimetria de exploração diferencial

ASTM E 537-76	Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis
ASTM E 473-85	Standard definitions of terms relating to thermal analysis
ASTM E 472-86	Standard practice for reporting thermoanalytical data
DIN 51005	Thermische Analyse, Begriffe

5. **Determinação do ponto de fluidez**

NBN 52014	Échantillonnage et analyse des produits du pétrole: point de trouble et point d'écoulement limite — Monsterneming en ontleding van aardolieproducten: Troebelingspunt en vloeipunt
ASTM D 97-66	Standard test method for pour point of petroleum oils
ISO 3016	Petroleum oils — Determination of pour point

▼B

A.2. TEMPERATURA DE EBULIÇÃO

1. MÉTODO

A maior parte dos métodos descritos baseia-se nas normas de ensaio da OCDE (1). Os princípios fundamentais encontram-se descritos nas referências (2) e (3).

1.1. INTRODUÇÃO

Os métodos e dispositivos aqui descritos podem ser aplicados a líquidos e a substâncias de baixo ponto de fusão, desde que não sofram uma reacção química para os valores da temperatura de ebulição (por exemplo: auto-oxidação, rearranjo, degradação, etc.). Os métodos podem ser aplicados a substâncias líquidas puras e impuras.

Dá-se maior importância aos métodos que utilizam a detecção por célula fotoeléctrica e aos métodos de análise térmica uma vez que esses métodos permitem a determinação das temperaturas de fusão e também das temperaturas de ebulição. Além disso, as medições podem ser efectuadas automaticamente.

O «método dinâmico» possui a vantagem de também poder ser aplicado à determinação da pressão de vapor e de não ser necessário corrigir o valor da temperatura de ebulição para a pressão normal (101,325 kPa) uma vez que a pressão normal pode ser ajustada durante a medição utilizando um manómetro.

Observações

A influência das impurezas na determinação da temperatura de ebulição depende bastante da natureza dessas impurezas. No caso de existirem na amostra impurezas voláteis que possam afectar os resultados, a substância deve ser purificada.

1.2. DEFINIÇÕES E UNIDADES

Define-se a temperatura de ebulição normal como sendo a temperatura para a qual a pressão de vapor de um líquido é de 101,325 kPa.

No caso de a temperatura de ebulição não ser medida à pressão atmosférica normal, a dependência da pressão do vapor em função da temperatura pode ser descrita pela equação de Clausius-Clapeyron:

$$\log p = \frac{\Delta H_v}{2{,}3RT} + const.$$

em que:

p = pressão de vapor da substância em pascal

ΔH_v = calor de vaporização em J mol^{-1}

R = constante universal dos gases perfeitos = 8,314 J mol^{-1} K^{-1}

T = temperatura termodinâmica em K

A temperatura de ebulição é especificada tendo em consideração a pressão ambiente durante a medição.

▼B

Conversões

Pressão (unidades: kPa)

100 kPa = 1 bar = 0,1 MPa

(«bar» ainda é uma unidade permitida mas não recomendada)

133 Pa = 1 mm Hg = 1 Torr

(as unidades «mm Hg» e «Torr» não são permitidas)

1 atm = atmosfera padrão = 101,325 Pa

(a unidade «atm» não é permitida)

Temperatura (unidades: K)

t = T - 273,15

t: temperatura de Celsius, graus Celsius (^{o}C)

T: temperatura termodinâmica, kelvin (K)

1.3. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

Não é necessário utilizar as substâncias de referência em todos os casos quando se investiga uma nova substância. Elas deverão servir essencialmente para aferir, periodicamente, o método e para permitir a comparação com resultados obtidos com outros métodos.

Nos métodos enumerados no apêndice é possível encontrar algumas substâncias utilizadas para calibração.

1.4. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

Existem cinco métodos para a determinação da temperatura de ebulição (intervalo de ebulição) que se baseiam na medição da temperatura de ebulição, e existem dois métodos que se baseiam na análise térmica.

1.4.1. **Determinação utilizando o ebuliómetro**

Os ebuliómetros foram originariamente desenvolvidos para a determinação do peso molecular por elevação da temperatura de ebulição, mas também são adequados para as medições exactas da temperatura de ebulição. Existe um aparelho muito simples que se encontra descrito na norma ASTM D 1120-72 (ver apêndice). O líquido é aquecido nesse aparelho, sob condições de equilíbrio à pressão atmosférica, até entrar em ebulição.

1.4.2. **Método dinâmico**

Este método implica a medição da temperatura de recondensação do vapor por meio de um termómetro apropriado no refluxo, mantendo-se a ebulição. Neste método é possível variar a pressão.

1.4.3. **Método da destilação para a determinação da temperatura de ebulição**

Este método compreende a destilação do líquido, a medição da temperatura de recondensação do vapor e a determinação da quantidade do destilado.

▼B

1.4.4. **Método de Siwoloboff**

Aquece-se uma amostra num tubo de ensaio, que é imerso num líquido num banho aquecido. Mergulha-se no tubo de ensaio um tubo capilar fechado, contendo uma bolha de ar na parte inferior.

1.4.5. **Detecção por célula fotoeléctrica**

Utilizando o princípio de Siwoloboff efectuam-se medições automáticas por célula fotoeléctrica das bolhas ascendentes.

1.4.6. **Análise térmica diferencial**

Esta técnica regista a diferença existente entre as temperaturas da substância e do material de referência, em função da temperatura, quando a substância e o material de referência são submetidos ao mesmo programa de temperatura controlada. Quando a amostra sofre uma transição que implica uma variação de entalpia, essa variação é indicada por um afastamento endotérmico (ebulição) em relação à linha de referência do registo de temperaturas.

1.4.7. **Calorimetria de exploração diferencial**

Esta técnica regista a diferença de absorção de energia existente entre uma substância e um material de referência, em função da temperatura, quando a substância e o material de referência são submetidos ao mesmo programa de temperatura controlada. Essa energia representa a energia necessária para estabelecer uma diferença nula de temperatura entre a substância e o material de referência. Quando a amostra sofre uma transição que implica uma alteração da entalpia, essa alteração é indicada por um afastamento endotérmico (ebulição), em relação à linha de referência do registo do fluxo do calor.

1.5. CRITÉRIOS DE QUALIDADE

A aplicabilidade e a precisão dos diferentes métodos utilizados para a determinação da temperatura de ebulição/intervalo de ebulição encontram-se resumidas no quadro 1.

Quadro 1

Comparação dos métodos

Método de medição	Precisão estimada	Norma existente
Ebuliómetro	± 1,4 K (até 373 K) (1) (2) ± 2,5 K (até 600 K) (1) (2)	ASTM D 1120-72 (1)
Método dinâmico	± 0,5 K (até 600 K) (2)	
Processo de destilação (intervalo de ebulição)	± 0,5 K (até 600 K)	ISO/R 918, DIN 53171, BS 4591/71
Método de Siwoloboff	± 2 K (até 600 K) (2)	
Detecção por célula fotoeléctrica	± 0,3 K (até 373 K) (2)	
Análise térmica diferencial	± 0,5 K (até 600 K) ± 2,0 K (até 1 273 K)	ASTM E 537-76
Calorimetria de exploração diferencial	± 0,5 K (até 600 K) ± 2,0 K (até 1 273 K)	ASTM E 537-76

(1) Esta precisão apenas é válida para um dispositivo simples, como, por exemplo, o descrito na norma ASTM D 1120-72; pode ser melhorada com ebuliómetros mais sofisticados.
(2) Válido apenas para substâncias puras. A utilização noutras circunstâncias deverá ser justificada.

▼B

1.6. DESCRIÇÃO DOS MÉTODOS

Os procedimentos de alguns destes métodos encontram-se descritos em normas internacionais e nacionais (ver apêndice).

1.6.1. **Ebuliómetro**

Ver apêndice.

1.6.2. **Método dinâmico**

Ver o método de ensaio A.4 para a determinação da pressão de vapor.

Regista-se a temperatura de ebulição observada para um valor da pressão aplicada de 101,325 kPa.

1.6.3. **Processo da destilação (intervalo de ebulição)**

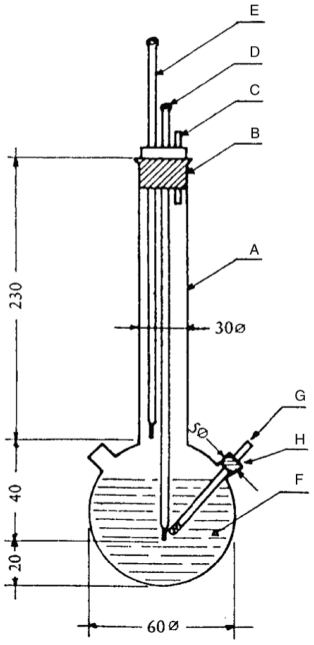
Ver apêndice.

1.6.4. **Método de Siwoloboff**

Aquece-se a amostra num aparelho para a determinação da temperatura de fusão num tubo de ensaio com um diâmetro de aproximadamente 5 mm (figura 1).

A figura 1 representa um tipo de aparelho normalizado para a determinação das temperaturas de fusão e de ebulição (JIS K 0064) (o material é vidro e todas as especificações são em milímetros).

Figura 1



A: Recipiente de medida
B: Rolha
C: Respiradouro
D: Termómetro
E: Termómetro auxiliar
F: Líquido do banho
G: Tubo de ensaio, diâmetro exterior com o máximo de 5 mm; contendo um tubo capilar com o comprimento aproximado de 100 mm, diâmetro interior de aproximadamente 1 mm e espessura da parede compreendida aproximadamente entre 0,2 e 0,3 mm
H: Tubo lateral

Coloca-se no tubo de ensaio um tubo capilar (capilar para a determinação do ponto de ebulição), o qual se encontra fechado a cerca de 1 cm acima da sua extremidade inferior. Adiciona-se a substância que se pretende testar de modo a que a parte fechada do capilar fique abaixo da superfície do líquido. O tubo de ensaio que contém o capilar para a determinação do ponto de ebulição é preso ao termómetro com uma fita de borracha ou fixado lateralmente com um suporte (ver figura 2).

▼B

Figura 2

Princípio de Siwoloboff

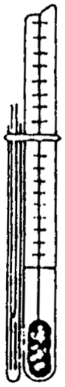
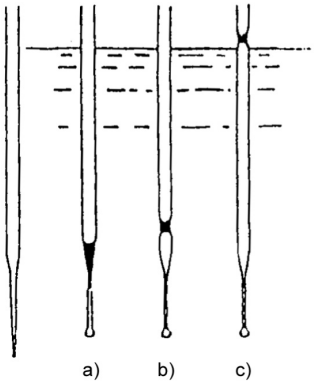


Figura 3

Princípio modificado



Escolhe-se o líquido do banho de acordo com a temperatura de ebulição. Para temperaturas até 573 K é possível utilizar óleo de silicone. A parafina líquida apenas pode ser utilizada até 473 K. O aquecimento do líquido do banho deve ser ajustado de modo a que a subida de temperatura seja de 3 K/minuto inicialmente. O líquido do banho deve ser agitado. Quando a temperatura atinge cerca de 10 K abaixo da temperatura de ebulição esperada, reduz-se o aquecimento de tal modo que o aumento de temperatura não ultrapasse 1 K/minuto. Ao aproximar-se a temperatura de ebulição, observa-se a formação de bolhas que emergem rapidamente do capilar utilizado para a determinação do ponto de ebulição.

A temperatura de ebulição é a temperatura para a qual, face a um arrefecimento momentâneo, cessa a corrente de bolhas e o fluido inicia repentinamente a subida no capilar. A leitura correspondente efectuada no termómetro é a temperatura de ebulição da substância.

De acordo com o princípio modificado (figura 3) determina-se a temperatura de ebulição num capilar para a determinação da temperatura de fusão. O capilar é distendido até se obter uma ponta fina com cerca de 2 cm de comprimento (a) e aspira-se uma pequena quantidade da amostra. Fecha-se por fusão a extremidade aberta do capilar de tal modo que na extremidade fique uma pequena bolha de ar. Enquanto se aquece o aparelho para a determinação da temperatura de fusão, a bolha de ar expande-se (b). A temperatura de ebulição corresponde à temperatura para a qual o tampão dessa substância atinge o nível da superfície do líquido do banho (c).

1.6.5. **Detecção por célula fotoeléctrica**

A amostra é aquecida num tubo capilar no interior de um bloco metálico aquecido.

Pelos orifícios existentes no bloco, é enviado um feixe de luz através da substância para uma célula fotoeléctrica calibrada com precisão.

Durante o aumento da temperatura da amostra emergem bolhas de ar simples provenientes do capilar de ebulição. Ao atingir-se a temperatura de ebulição o número de bolhas aumenta fortemente. Isto provoca uma alteração na intensidade da luz registada pela célula fotoeléctrica, que envia um sinal de paragem transmitido para o indicador que efectua a leitura da temperatura num termómetro de resistência de platina localizado no bloco.

Este método é especialmente útil, uma vez que permite determinações de valores inferiores à temperatura ambiente e até 253,15 K (- 20°C) sem qualquer modificação no aparelho. Apenas é necessário colocar o instrumento num banho de arrefecimento.

▼B

1.6.6. **Análise térmica**

1.6.6.1. *Análise térmica diferencial*

Ver apêndice.

1.6.6.2. *Calorimetria de exploração diferencial*

Ver apêndice.

2. **RESU LTADOS**

Para pequenos desvios em relação à pressão normal (máximo ± 5 kPa), as temperaturas de ebulição são corrigidas para o valor T_n pela equação de conversão de Sidney Young:

$$T_n = T + (f_T \times \Delta p)$$

em que:

Δp = (101,325 - p) [atenção ao sinal]

p = pressão medida em kPa

f_T = taxa de variação da temperatura de ebulição com a pressão em K/kPa

T = temperatura de ebulição medida em K

T_n = temperatura de ebulição corrigida para a pressão normal, em K

Os factores para a correcção da temperatura, o valor f_T e as equações para a sua aproximação estão descritos nas normas internacionais e nacionais anteriormente referidas para diversas substâncias.

Por exemplo, o método DIN 53171 refere as seguintes correcções aproximadas para solventes incorporados em tintas:

Quadro 2

Temperatura — factores de correcção f_T

Temperatura T (K)	Factor de correcção f_T (K/kPa)
323,15	0,26
348,15	0,28
373,15	0,31
398,15	0,33
423,15	0,35
448,15	0,37
473,15	0,39
498,15	0,41
523,15	0,44
548,15	0,45
573,15	0,47

▼B

3. **RELATÓRIO**

O relatório do ensaio deverá conter, se possível, a informação seguinte:

— método utilizado,

— especificação exacta da substância (identificação e impurezas) e fases prévias de purificação, se for caso disso,

— uma estimativa da precisão.

Estabelece-se que a temperatura de ebulição é a média de pelo menos duas medições situadas no intervalo de precisão estimada (ver quadro 1).

As temperaturas de ebulição medidas e os seus valores médios deverão ser especificados e os valores da pressão para os quais se efectuaram as medições deverão ser apresentados em kPa. Preferencialmente a pressão deverá ser próxima da pressão atmosférica normal.

Todas as informações e notas relevantes para a interpretação de resultados deverão ser apresentadas, especialmente no que diz respeito às impurezas e estado físico da substância.

4. **REFERÊNCIAS**

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 103, Decision of the Council C(81) 30 final.

(2) IUPAC, B. Le Neindre, B. Vodar, eds. Experimental thermodynamics, Butterworths, London, 1975, vol. II.

(3) R. Weissberger ed.: Technique of organic chemistry, Physical methods of organic chemistry, 3rd ed., Interscience Publ., New York, 1959, vol. I, Part I, Chapter VIII.

▼B

Apêndice

Para pormenores técnicos adicionais é possível consultar, por exemplo, as normas seguintes:

1. **Ebuliómetro**

1.1 Dispositivos de medição da temperatura de fusão com banho líquido

ASTM D 1120-72	Standard test method for boiling point of engine anti-freezes

2. **Processo de destilação (intervalo de ebulição)**

ISO/R 918	Test Method for Distillation (Distillation Yield and Distillation Range)
BS 4349/68	Method for determination of distillation of petroleum products
BS 4591/71	Method for the determination of distillation characteristics
DIN 53171	Lösungsmittel für Anstrichstoffe, Bestimmung des Siedeverlaufes
NF T 20-608	Distillation: détermination du rendement et de 1'intervalle de distillation

3. **Análise térmica diferencial e calorimetria de exploração diferencial**

ASTM E 537-76	Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis
ASTM E 473-85	Standard definitions of terms relating to thermal analysis
ASTM E 472-86	Standard practice for reporting thermoanalytical data
DIN 51005	Thermische Analyse: Begriffe

▼B

A.3. DENSIDADE RELATIVA

1. MÉTODO

Os métodos descritos baseiam-se nas Normas de Ensaio da OCDE (1). Os princípios fundamentais encontram-se na referência (2).

1.1. INTRODUÇÃO

Os métodos descritos para a determinação da densidade relativa são aplicáveis a substâncias sólidas e a substâncias líquidas, sem qualquer restrição no que diz respeito ao seu grau de pureza. Os diversos métodos utilizáveis encontram-se resumidos no quadro 1.

1.2. DEFINIÇÕES E UNIDADES

A densidade relativa D^{20}_4 de um sólido ou de um líquido é a razão entre a massa de um determinado volume da substância que se pretende testar, à temperatura de 20 °C, e a massa de igual volume de água, à temperatura de 4 °C. A densidade relativa não tem dimensões.

A densidade, p, de uma substância é o quociente entre a massa, m, e o seu volume, v.

A densidade, p, é dada, em unidades do SI, em kg/m^3.

1.3. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA (1) (3)

Não é necessário utilizar substâncias de referência em todos os casos quando se está a investigar uma nova substância. Essas substâncias servem essencialmente para verificar, de vez em quando, a calibração do método e para proporcionar a comparação com resultados obtidos com outros métodos.

1.4. PRINCÍPIO DOS MÉTODOS

Recorre-se à utilização de quatro classes de métodos.

1.4.1. **Métodos de flutuação**

1.4.1.1. *Hidrómetro (para substâncias líquidas)*

É possível efectuar determinações rápidas e suficientemente exactas de densidade utilizando hidrómetros de flutuação, os quais permitem obter a densidade de um líquido a partir da profundidade de imersão por simples leitura de uma escala graduada.

1.4.1.2. *Balança hidrostática* (para substâncias líquidas e sólidas)

Pode recorrer-se à diferença entre o peso de uma amostra testada medido ao ar e num líquido adequado (por exemplo água) para se determinar a sua densidade.

No caso dos sólidos, a densidade medida é apenas representativa da amostra particular utilizada. Para a determinação da densidade de líquidos pesa-se primeiro ao ar um corpo de volume conhecido, v, e depois pesa-se mergulhado no líquido.

1.4.1.3. *Método do corpo imerso* (para substâncias líquidas) (4)

De acordo com este método determina-se a densidade de um líquido a partir da diferença entre os resultados da pesagem do líquido antes e após a imersão, nesse líquido, de um corpo de volume conhecido.

▼B

1.4.2. **Métodos do picnómetro**

Tanto para os sólidos como para os líquidos é possível utilizar picnómetros de configurações diversas e com volumes conhecidos. Calcula-se a densidade a partir da diferença em peso entre o picnómetro cheio e vazio e pelo conhecimento do seu volume.

1.4.3. **Picnómetro por comparação ao ar** (para sólidos)

Pode medir-se a densidade de um sólido de qualquer configuração, à temperatura ambiente, utilizando o picnómetro de comparação de gases. Mede-se o volume de uma substância ao ar ou num gás inerte, usando um cilindro de volume calibrado variável. Para se calcular a densidade efectua-se uma medição de massa depois da medição de volume.

1.4.4. **Densímetro oscilante** (5) (6) (7)

É possível medir a densidade de um líquido utilizando um densímetro oscilante. Utiliza-se um oscilador mecânico com a forma de um tubo em U o qual se faz vibrar à frequência de ressonância do oscilador, a qual depende da sua massa. A introdução de uma amostra altera a frequência de ressonância do oscilador. O aparelho tem de ser calibrado utilizando duas substâncias líquidas de densidades conhecidas. Essas substâncias deverão ser preferencialmente escolhidas de tal modo que as suas densidades relativas cubram o intervalo que se pretende medir.

1.5. CRITÉRIOS DE QUALIDADE

A aplicabilidade dos diversos métodos utilizados para a determinação da densidade relativa encontra-se resumida no quadro.

1.6. DESCRIÇÃO DOS MÉTODOS

As normas apresentadas como exemplos, que devem ser consultadas para obtenção de pormenores técnicos adicionais, estão mencionadas no apêndice.

Os testes devem ser efectuados à temperatura de 20 ^{o}C e deverão ser realizadas pelo menos duas medições.

2. **RESULTADOS**

Ver normas.

3. **RELATÓRIO**

O relatório do ensaio deverá conter, se possível, a informação seguinte:

— método utilizado,

— especificação exacta da substância (identificação e impurezas) e fases prévias de purificação, se as houver.

A densidade relativaD_4^{20} deverá constar do relatório conforme definido em 1.2, em conjunto com o estado físico da substância ensaiada.

No relatório devem constar todas as informações e notas relevantes para a interpretação dos resultados, especialmente no que diz respeito a impurezas e ao estado físico da substância.

▼B

Quadro

Aplicabilidade dos métodos

Método de medida	Densidade		Viscosidade dinâmica máxima possível	Normas existentes
	Sólido	Líquido		
1.4.1.1. Hidrómetro		Sim	5 Pa s	ISO 387, ISO 649-2, NF T 20-050
1.4.1.2. Balança hidrostática				
a) sólidos	Sim			ISO 1183 (A)
b) líquidos		Sim	5 Pa s	ISO 901 e 758
1.4.1.3. Método do corpo imerso		Sim	20 Pa s	DIN 53217
1.4.2. Picnómetro				ISO 3507
a) sólidos	Sim			ISO 1183 (B), NF T 20-053
b) líquidos		Sim	500 Pa s	ISO 758
1.4.3. Picnómetro por comparação ao ar	Sim			DIN 55990 parte 3, DIN 53243
1.4.4. Densímetro oscilante		Sim	5 Pa s	

4. **REFERÊNCIAS**

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 109, Decision of the Council C(8l) 30 final.

(2) R. Weissberger ed., Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Chapter IV, Interscience Publ., New York, 1959, vol. I, Part l.

(3) IUPAC, Recommended reference materiais for realization of physico-chemical properties, Pure and applied chemistry, 1976, vol. 48, p. 508.

(4) Wagenbreth, H., Die Tauchkugel zur Bestimmung der Dichte von Flüssigkeiten, Technisches Messen tm, 1979, vol. ll, p. 427-430.

(5) Leopold, H., Die digitale Messung von Flüssigkeiten, Elektronik, 1970, vol. 19, p. 297-302.

(6) Baumgarten, D., Füllmengenkontrolle bei vorgepackten Erzeugnissen — Verfahren zur Dichtebestimmung bei flüssigen Produkten und ihre praktische Anwendung, Die Pharmazeutische Industrie, 1975, vol. 37, p. 717-726.

(7) Riemann, J., Der Einsatz der digitalen Dichtemessung im Brauereilaboratorium, Brauwissenschaft, 1976, vol. 9, p. 253-255.

▼B

Apêndice

Para obtenção de pormenores técnicos adicionais é possível consultar, por exemplo, as normas seguintes:

1. **Métodos de flutuação**

1.1. Hidrómetro

DIN 12790, ISO 387	Hidrómetro; instruções gerais
DIN 12791	Parte I: Hidrómetros de densidade; sua construção, ajustamento e utilização Parte II: Hidrómetros de densidade; dimensões normalizadas, designação Parte III: Utilização e teste
ISO 649-2	Objectos de vidro laboratoriais: hidrómetros de densidade para fins gerais
NF T 20-050	Produtos químicos para utilização industrial — Determinação da densidade de líquidos — Método areométrico
DIN 12793	Objectos de vidro laboratoriais: hidrómetros de resolução variável

1.2. Balança hidrostática

Para as substâncias sólidas

ISO 1183	Método A: Métodos para a determinação da densidade e para a determinação da densidade relativa de plásticos excluindo os plásticos celulares
NF T 20-049	Produtos químicos para utilização industrial — Determinação da densidade de sólidos que não sejam pós e de produtos celulares — Método da balança hidrostática
ASTM-D-792	Determinação do peso específico e da densidade de plásticos por deslocamento
DIN 53479	Testes de plásticos e de elastómeros; determinação da densidade

Para substâncias líquidas

ISO 901	ISO 758

▼B

DIN 51757	Testes de óleos minerais e de materiais afins; determinação da densidade
ASTM D 941-55, ASTM D 1296-67 e ASTM D 1481-62	
ASTM D 1298	Densidade, peso específico ou densidade relativa IPA (indicador de posição atmosférico) do petróleo bruto e de produtos derivados de petróleo líquido pelo método do hidrómetro
BS 4714	Densidade, peso específico ou densidade IPA (indicador de posição atmosférico) do petróleo bruto e de produtos derivados de petróleo líquido pelo método do hidrómetro

1.3. Método do corpo imerso

DIN 53217	Testes de tintas, de vernizes e de materiais de revestimentos análogos; determinação da densidade; método do corpo imerso

2. **Métodos picnométricos**

2.1. Para substâncias líquidas

ISO 3507	Picnómetros
ISO 758	Produtos químicos líquidos; determinação da densidade à temperatura de 20 ^{o}C
DIN 12797	Picnómetro de Gay-Lussac (para líquidos não voláteis que não sejam muito viscosos)
DIN 12798	Picnómetro de Lipkin (para líquidos com uma viscosidade cinemática inferior a $100,10^{-6}$ m^2 s^{-1} à temperatura de 15 ^{o}C)
DIN 12800	Picnómetro de Sprengel (para líquidos conforme a norma DIN 12798)
DIN 12801	Picnómetro de Reischauer (para líquidos com uma viscosidade cinemática inferior a $100,10^{-6}m^2s^{-1}$ à temperatura de 20 ^{o}C, aplicável em particular também aos hidrocarbonetos e às soluções aquosas e bem assim aos líquidos com uma pressão de vapor superior, aproximadamente 1 bar à temperatura de 90 ^{o}C)

▼B

DIN 12806	Picnómetro de Hubbard (para líquidos viscosos de todos os tipos e que não possuam uma pressão de vapor demasiadamente elevada, aplicável particularmente também para tintas, vernizes e betumes)
DIN 12807	Picnómetro de Bingham (para líquidos, conforme a norma DIN 12801)
DIN 12808	Picnómetro de Jaulmes (em particular para a mistura de etanol e água)
DIN 12809	Picnómetro com termómetro incorporado e tubo lateral capilar (para líquidos que não sejam muito viscosos)
DIN 53217	Testes de tintas, de vernizes e de produtos análogos; determinação da densidade com picnómetro
DIN 51757	Ponto 7: Testes de óleos minerais e de materiais afins; determinação da densidade
ASTM D 297	Secção 15: Produtos de borracha — análise química
ASTM D 2111	Método C: Compostos orgânicos halogenados
BS 4699	Método para a determinação do peso específico e da densidade de produtos derivados do petróleo (método do picnómetro bicapilar graduado)
BS 5903	Método para a determinação da densidade relativa e da densidade de produtos derivados do petróleo recorrendo ao método do picnómetro de capilar fechado
NF T 20-053	Produtos químicos para utilização industrial — Determinação da densidade de sólidos convertidos em pó e de líquidos — Método picnométrico

▼B

2.2. Para substâncias sólidas

ISO 1183	Método B: Método para a determinação da densidade e da densidade relativa dos plásticos com exclusão dos plásticos celulares
NF T 20-053	Produtos químicos para utilização industrial — Determinação da densidade de sólidos convertidos em pó e de líquidos — Método picnométrico
DIN 19683	Determinação da densidade de solos

3. **Picnómetro por comparação ao ar**

DIN 55990	Parte III: Prüfung von Anstrichstoffen und ähnlichen Beschichtungsstoffen; Pulverlack; Bestimmung der Dichte
DIN 53243	Anstrichstoffe; Chlorhaltige Polymere; Prüfung

▼M1

A.4. PRESSÃO DE VAPOR

1. MÉTODO

O presente método é equivalente ao método OCDE TG 104 (2004).

1.1. INTRODUÇÃO

A presente versão revista do Método A.4 (1) inclui um método adicional, o método de efusão: termogravimetria isotérmica, concebido para produtos químicos com pressões de vapor muito baixas (até 10^{-10} Pa). Tendo em conta a necessidade de procedimentos, em especial para a determinação da pressão de vapor de substâncias com uma pressão de vapor muito baixa, as gamas de aplicação de outros procedimentos deste método foram reavaliadas.

Em equilíbrio termodinâmico, a pressão de vapor de uma substância pura é exclusivamente função da temperatura. Os princípios fundamentais são descritos noutro local (2) (3).

Não existe nenhum procedimento único de medição que seja aplicável a toda a gama de pressões de vapor, desde menos de 10^{-10} Pa até 10^5 Pa. O presente método inclui oito métodos diferentes de medição da pressão de vapor, que podem ser aplicados em função da gama de pressões em causa. A aplicação e a gama de medição dos diferentes métodos são comparadas no quadro 1. Estes métodos só podem ser aplicados para compostos que não sejam degradados nas condições de ensaio. Nos casos em que os métodos experimentais não sejam aplicáveis por motivos técnicos, a pressão de vapor pode também ser estimada, e o anexo apresenta um método recomendado para essa estimativa.

1.2. DEFINIÇÕES E UNIDADES

A pressão de vapor de uma substância é a pressão de saturação exercida sobre uma substância sólida ou líquida.

Deve ser utilizada a unidade SI de pressão, o Pascal (Pa). Apresentam-se a seguir outras unidades que têm sido utilizadas, com os respectivos factores de conversão:

1 Torr	=	1 mm Hg	=	$1{,}333 \times 10^2$ Pa
1 atmosfera	=	$1{,}013 \times 10^5$ Pa		
1 bar	=	10^5 Pa		

A unidade SI de temperatura é o Kelvin (K). A conversão de graus centígrados em graus Kelvin é dada pela fórmula:

$$T = t + 273{,}15$$

onde T é a temperatura Kelvin ou temperatura termodinâmica e t é a temperatura em graus centígrados.

▼**M1**

Quadro 1

Método de medição	Substâncias		Repetibilidade estimada	Reprodutividade estimada	Gama recomendada:
	Sólidas	Líquidas			
Método dinâmico	Fusão a baixa temperatura	Sim	Até 25 % 1 a 5 %	Até 25 % 1 a 5 %	10^3 Pa a 2×10^3 Pa 2×10^3 Pa a 10^5 Pa
Método estático	Sim	Sim	5 a 10 %	5 a 10 %	10 Pa a 10^5 Pa 10^{-2} Pa a 10^5 Pa ([1])
Método do isoteniscópio	Sim	Sim	5 a 10 %	5 a 10 %	10^2 Pa a 10^5 Pa
Método de efusão: equilíbrio de pressão de vapor	Sim	Sim	5 a 20 %	Até 50 %	10^{-3} Pa a 1 Pa
Método de efusão: célula de Knudsen	Sim	Sim	10 a 30 %	—	10^{-10} Pa a 1 Pa
Método de efusão: termogravimetria isotérmica	Sim	Sim	5 a 30 %	Até 50 %	10^{-10} Pa a 1 Pa
Método da saturação de gases	Sim	Sim	10 a 30 %	Até 50 %	10^{-10} Pa a 10^3 Pa
Método de rotação	Sim	Sim	10 a 20 %	—	10^{-4} Pa a 0,5 Pa

([1]) Utilizando um manómetro de capacitância.

1.3. PRINCÍPIO DO ENSAIO

Em geral, a pressão de vapor é determinada a diferentes temperaturas. Numa gama limitada de temperaturas, o logaritmo da pressão de vapor de uma substância pura é função linear do inverso da temperatura termodinâmica, de acordo com a equação de Clapeyron-Clausius simplificada:

$$\log p = \frac{\Delta Hv}{2{,}3RT} + constante$$

onde:

p = pressão de vapor, em Pascal

ΔHv = calor de vaporização, em J mol^{-1}

R = constante universal dos gases perfeitos, 8,314 J mol^{-1} K^{-1}

T = temperatura, em K

▼**M1**

1.4. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

Não é necessário utilizar substâncias de referência. Essas substâncias servem fundamentalmente para verificar periodicamente o desempenho de um método, permitindo ainda a comparação entre os resultados de diferentes métodos.

1.5. DESCRIÇÃO DO MÉTODO

1.5.1. **Método dinâmico (método de Cottrell)**

1.5.1.1. *Princípio*

A pressão de vapor é determinada medindo a temperatura de ebulição da substância a diferentes pressões pré-estabelecidas, mais ou menos entre 10^3 a 10^5 Pascal. Este método é igualmente recomendado para a determinação da temperatura de ebulição. Para esse efeito, pode ser utilizado até 600 K. As temperaturas de ebulição dos líquidos são aproximadamente 0,1 °C mais elevadas a uma profundidade de 3 a 4 cm do que à superfície, devido à pressão hidrostática da coluna de líquido. No caso do método de Cottrell (4), o termómetro é colocado no vapor, acima da superfície do líquido, e o líquido em ebulição é bombeado em contínuo sobre a ponta do termómetro. Uma fina camada do líquido, que se encontra em equilíbrio com o vapor à pressão atmosférica, forma-se em torno da ponta do termómetro. Deste modo, o termómetro lê o verdadeiro ponto de ebulição, sem erros devidos ao sobreaquecimento ou à pressão hidrostática. A bomba originalmente utilizada por Cottrell é apresentada na figura 1. O tubo A contém o líquido em ebulição. O fio de platina B, selado no fundo do tubo, facilita uma ebulição uniforme. O tubo lateral C conduz a um condensador, enquanto que a manga D evita que o condensado frio atinja o termómetro E. Quando o líquido contido em A entra em ebulição, as bolhas e o líquido recolhidos pelo funil são transportados pelos dois braços da bomba F até à ponta do termómetro.

Figura 1

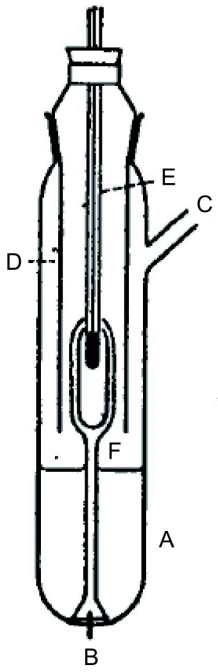
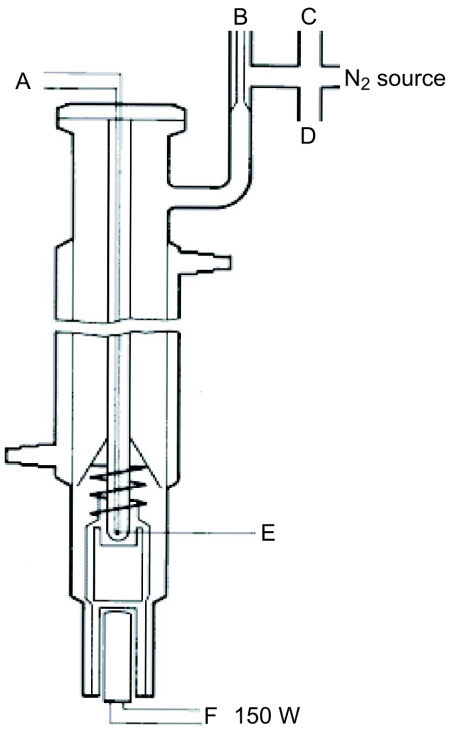


Figura 2



▼**M1**

Bomba de Cottrell (4)

A: Termopar

B: Volume tampão de vácuo

C: Manómetro

D: Vácuo

E: Ponto de medição

F: Resistência, cerca de 150 W

1.5.1.2. *Equipamento*

A figura 2 mostra um aparelho de alta precisão que utiliza o princípio de Cottrell. O aparelho consiste num tubo com uma secção inferior para a ebulição, um condensador na parte intermédia e uma saída com flange na parte superior. A bomba de Cottrell é colocada na secção de ebulição, obtida através de uma resistência eléctrica. A temperatura é medida por um termopar coberto ou por um termómetro de resistência, inseridos através da flange, na parte superior. A saída é ligada a um sistema de regulação da pressão, composto por uma bomba de vácuo, um volume tampão, um manostato de admissão de azoto para a regulação da pressão e um manómetro.

1.5.1.3. *Procedimento*

A substância é colocada na secção de ebulição. É possível que surjam problemas com sólidos não pulverizados, mas esta questão pode por vezes ser resolvida aquecendo a água da manga de arrefecimento. O aparelho é selado a nível da flange e a substância é desgaseificada. Este processo não é aplicável às substâncias que provocam a formação de espuma.

Estabiliza-se a pressão ao nível mais baixo a que se pretende efectuar a leitura e o sistema de aquecimento é posto a funcionar. Ao mesmo tempo, o sensor de temperatura é ligado a um registador.

O equilíbrio é atingido quando se regista uma temperatura de ebulição constante a pressão constante. É necessário ter o cuidado de evitar que o aparelho seja sacudido durante a ebulição. Além disso, deve garantir-se a condensação total no sistema de arrefecimento. Para a determinação da pressão de vapor de sólidos com baixo ponto de fusão, é necessário tomar precauções para evitar o bloqueio do condensador.

Depois de registar este ponto de equilíbrio, passa-se para uma pressão mais elevada. Repete-se este processo até se atingir a pressão de 10^5 Pa (aproximadamente 5 a 10 pontos de medição na totalidade). Para fins de verificação, os pontos de equilíbrio deverão ser repetidos para valores decrescentes de pressão.

1.5.2. **Método estático**

1.5.2.1. *Princípio*

No método estático (5), a pressão de vapor em equilíbrio termodinâmico é determinada a uma dada temperatura. Este método é aplicável para substâncias e para líquidos e sólidos compostos numa gama de pressões entre os 10^{-1} e os 10^5 Pa, podendo, com os devidos cuidados, ser também utilizado na gama de 1 a 10 Pa.

▼**M1**

1.5.2.2. *Equipamento*

O equipamento consiste num banho a temperatura constante (precisão de ± 0,2 K), num recipiente para a amostra, ligado a uma linha de vácuo, num manómetro e num sistema de regulação da pressão. A câmara que contém a amostra (figura 3a) é ligada à linha de vácuo através de uma válvula e de um manómetro diferencial (tubo em U cheio com um fluido manométrico apropriado), que servirá de indicador do zero. O manómetro diferencial poderá ser cheio com mercúrio, silicones ou ftalatos, dependendo da gama de pressões e do comportamento químico da substância em estudo. No entanto, a utilização de mercúrio deve, sempre que possível, ser evitada por razões ambientais. A substância em estudo não deve dissolver-se de forma perceptível nem reagir com o fluido contido no tubo em U. Em vez de um tubo em U, pode utilizar-se um manómetro com indicador da pressão (figura 3b). No caso do manómetro, o mercúrio pode ser utilizado para pressões entre a pressão normal e os 10^2 Pa, enquanto que os fluidos de silicone e os ftalatos são apropriados para pressões abaixo dos 10^2 Pa, até 10 Pa. Existem outros manómetros que podem ser utilizados abaixo dos 10^2 Pa e os manómetros de membrana aquecível podem mesmo ser utilizados para valores inferiores a 10^{-1} Pa. A temperatura é medida na parede externa do recipiente que contém a amostra ou no interior do mesmo.

1.5.2.3. *Procedimento*

Utilizando o aparelho descrito na figura 3a, enche-se o tubo em U com o líquido escolhido, que deve ser desgaseificado a temperatura elevada antes de se proceder às leituras. A substância em estudo é colocada no aparelho e desgaseificada a baixa temperatura. Caso a amostra seja um composto, a temperatura deverá ser suficientemente baixa para evitar qualquer alteração da composição do material. O equilíbrio pode ser estabelecido mais rapidamente por agitação. A amostra pode ser arrefecida com azoto líquido ou com gelo seco, mas deve ter-se o cuidado de evitar a condensação do ar ou do fluido da bomba. Com a válvula de cima do recipiente da amostra aberta, aplica-se sucção durante vários minutos, para remoção do ar. Se necessário, a operação de desgasificação deve ser repetida várias vezes.

Figura 3a

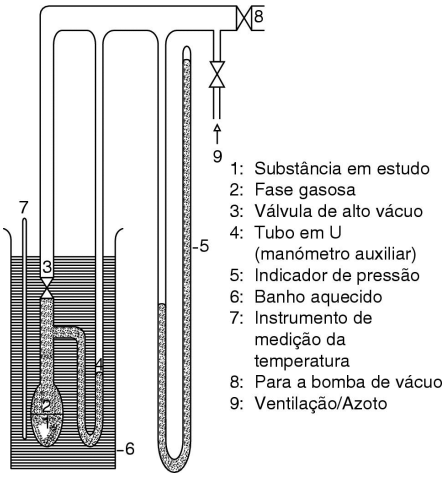
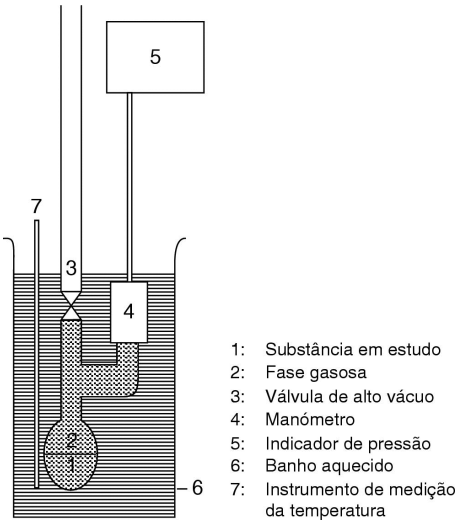


Figura 3b



▼**M1**

Quando a amostra é aquecida com a válvula fechada, a pressão de vapor aumenta, o que altera o equilíbrio do fluido no tubo em U. Para compensar este fenómeno, permite-se a entrada de azoto ou de ar no aparelho até que o indicador de pressão diferencial marque novamente zero. A pressão necessária para que tal ocorra pode ser lida no manómetro ou através de um instrumento de maior precisão. Essa pressão corresponde à pressão de vapor da substância para essa temperatura de medição. Utilizando o aparelho descrito na Figura 3b, a pressão de vapor pode ser lida directamente.

A pressão de vapor é determinada para pequenos intervalos adequados de temperatura (aproximadamente 5 a 10 pontos de medição na totalidade), até à temperatura máxima pretendida.

Para fins de verificação, as leituras a baixas temperaturas devem ser repetidas. Caso os valores obtidos na repetição das leituras não coincidam com a curva obtida para os valores crescentes de temperatura, isso poderá dever-se às seguintes razões:

i) a amostra ainda contém ar (p.ex.: materiais de elevada viscosidade) ou substâncias com um ponto de fusão mais baixo, que são libertadas durante o aquecimento;

ii) a substância sofreu uma reacção química no intervalo de temperatura estudado (p. ex.: decomposição, polimerização).

1.5.3. **Método do isoteniscópio**

1.5.3.1. *Princípio*

O isoteniscópio (6) baseia-se no princípio do método estático. O método implica a colocação da amostra numa ampola que é mantida a temperatura constante e que está ligada a um manómetro e a uma bomba de vácuo. As impurezas mais voláteis do que a substância em estudo são eliminadas por desgasificação a baixa pressão. A pressão de vapor da amostra às temperaturas seleccionadas será equilibrada contra uma pressão conhecida de um gás inerte. O isoteniscópio foi desenvolvido para medição da pressão de vapor de determinados hidrocarbonetos líquidos, mas também é aplicável para o estudo de sólidos. Normalmente, este método não é adequado para sistemas com múltiplos componentes. Os resultados estarão sujeitos a ligeiros erros, caso as amostras contenham impurezas não voláteis. A gama recomendada é de 10^2 a 10^5 Pa.

1.5.3.2. *Equipamento*

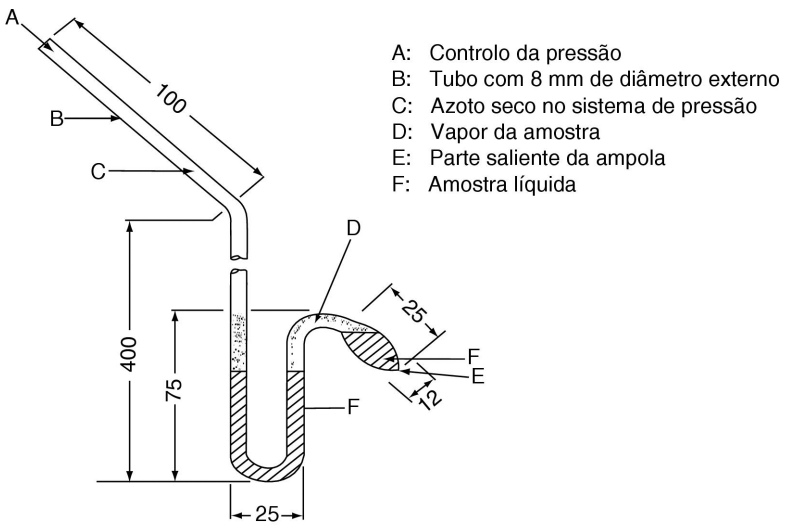
A figura 4 mostra um exemplo típico de dispositivo de medição. A descrição completa pode ser consultada no ATSM D 2879-86 (6).

▼**M1**

1.5.3.3. *Procedimento*

No caso dos líquidos, a própria substância serve como fluido para o manómetro diferencial. Coloca-se no isoteniscópio uma quantidade de líquido suficiente para encher a ampola e o segmento mais curto do manómetro. O isoteniscópio é ligado a um sistema de vácuo e purgado, sendo depois enchido com azoto. Repete-se duas vezes a evacuação e a purga do sistema, para garantir a remoção do oxigénio residual. Coloca-se o isoteniscópio cheio em posição horizontal, de modo a que a amostra se espalhe numa camada fina sobre a ampola da amostra e o manómetro. Reduz-se a pressão do sistema para 133 Pa e aquece-se suavemente a amostra até entrar em ligeira ebulição (remoção dos gases dissolvidos). O isoteniscópio é depois colocado de forma a que a amostra regresse à ampola e encha a secção mais curta do manómetro. A pressão é mantida a 133 Pa. A parte saliente da ampola é aquecida em chama fraca até que o vapor libertado pela amostra se expanda suficientemente para deslocar parte da amostra da parte superior da ampola para o interior do manómetro, criando um espaço cheio de vapor da amostra e livre de azoto. Coloca-se depois o isoteniscópio num banho a temperatura constante, ajustando a pressão do azoto até ser idêntica à da amostra. Em situação de equilíbrio, a pressão de azoto é igual à pressão de vapor da substância.

Figura 4



(Dimensões em milímetros)

No caso dos sólidos, em função das gamas de pressão e de temperatura, poderão ser utilizados no manómetro líquidos como os fluidos de silicone ou os ftalatos. O líquido do manómetro, depois de desgaseificado, é utilizado para encher uma protuberância existente no segmento mais longo do isoteniscópio. Depois, coloca-se na ampola o sólido em estudo e desgaseifica-se a alta temperatura. O isoteniscópio é então inclinado de modo a que o líquido do manómetro possa correr para o tubo em U.

▼M1

1.5.4. **Método de efusão: equilíbrio de pressão de vapor** (7)

1.5.4.1. *Princípio*

Uma amostra da substância em estudo é aquecida num pequeno forno e colocada numa campânula onde o ar foi esgotado. O forno é coberto com uma tampa, com pequenos orifícios de diâmetro conhecido. O vapor libertado pela substância e que se escapa por um dos orifícios é dirigido para o prato de uma balança de precisão, que também se deverá encontrar no interior da mesma campânula. Em certas montagens, o prato da balança pode estar rodeado por uma caixa de refrigeração que conduza o calor dissipado para o exterior por condução térmica, sendo arrefecido por radiação de modo a condensar o vapor que se escapa da substância. O momento gerado pelo jacto de vapor actua como uma força sobre o prato da balança. A pressão de vapor pode ser deduzida de duas formas: directamente a partir da força exercida sobre o prato da balança ou através da velocidade de evaporação, utilizando a equação de Hertz-Knudsen (2):

$$p = G\sqrt{\frac{2\pi RT \times 10^3}{M}}$$

onde:

G = velocidade de evaporação (kg s^{-1} m^{-2})

M = massa molar (g mol^{-1})

T = temperatura (K)

R = constante universal dos gases perfeitos (J mol^{-1} K^{-1})

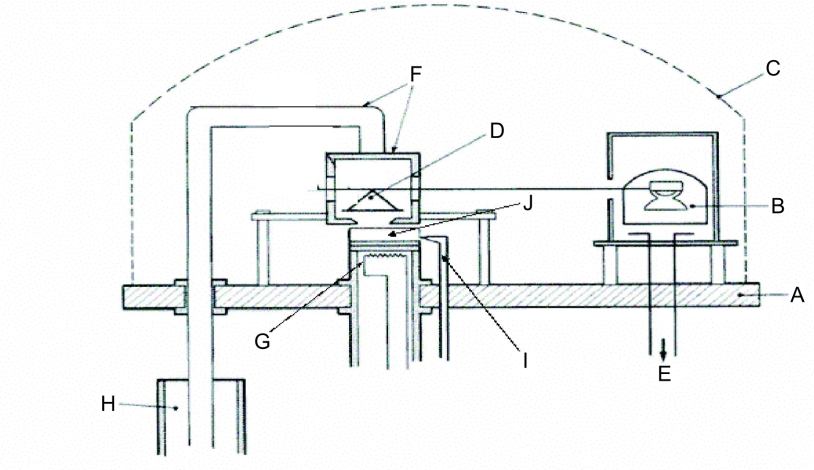
P = pressão de vapor (Pa)

A gama recomendada é de 10^{-3} a 1 Pa.

1.5.4.2. *Equipamento*

O princípio geral do aparelho é ilustrado na figura 5.

Figura 5



A: Base plate

B: Moving coil instrument

C: Bell jar

D: Balance with scale pan

E: Vacuum measuring device

F: Refrigeration box and cooling bar

G: Evaporator furnace

H: Dewar flask with liquid nitrogen

I: Measurement of temperature of sample

J: Test Substance

▼M1

1.5.5. **Método de efusão: célula de Knudsen**

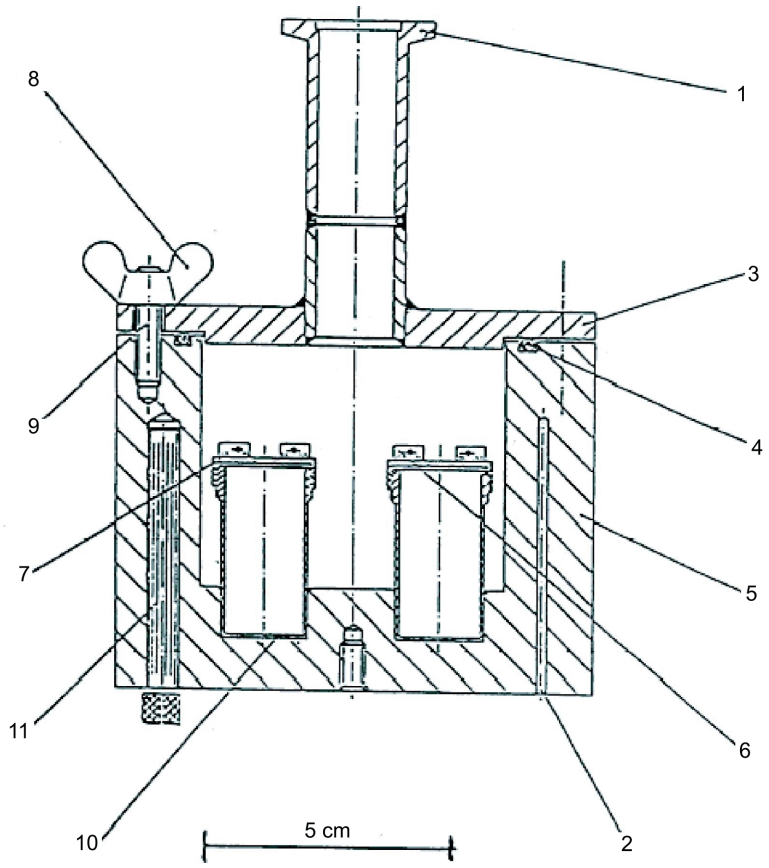
1.5.5.1. *Princípio*

O método baseia-se na estimativa da massa da substância em estudo que flui para o exterior a partir de uma célula de Knudsen em cada unidade de tempo (8) sob a forma de vapor, através de um micro-orifício, em condições de ultravácuo. A massa de vapor efluente pode ser calculada através da determinação da massa perdida pela célula ou condensando o vapor a baixa temperatura e determinando a quantidade de substância que se volatilizou, por cromatografia. A pressão de vapor é calculada através da relação de Heinz-Knudsen (ver o ponto 1.5.4.1), com aplicação de factores de correcção que dependem dos parâmetros do aparelho (9). A gama recomendada é de 10^{-10} to 1 Pa (10)(11)(12)(13)(14).

1.5.5.2. *Equipamento*

O princípio geral do aparelho é ilustrado na figura 6.

Figura 6



1:	Connection to vacuum	7:	Threaded lid
2:	Wells from platinum resistance thermometer or temperature measurement and control	8:	Butterfly nuts
3:	Lid for vacuum tank	9:	Bolts
4:	O-ring	10:	Stainless steel effusion cells
5:	Aluminum vacuum tank	11:	Heater cartridge
6:	Device for installing and removing the effusion cells		

▼M1

1.5.6. **Método de efusão: termogravimetria isotérmica**

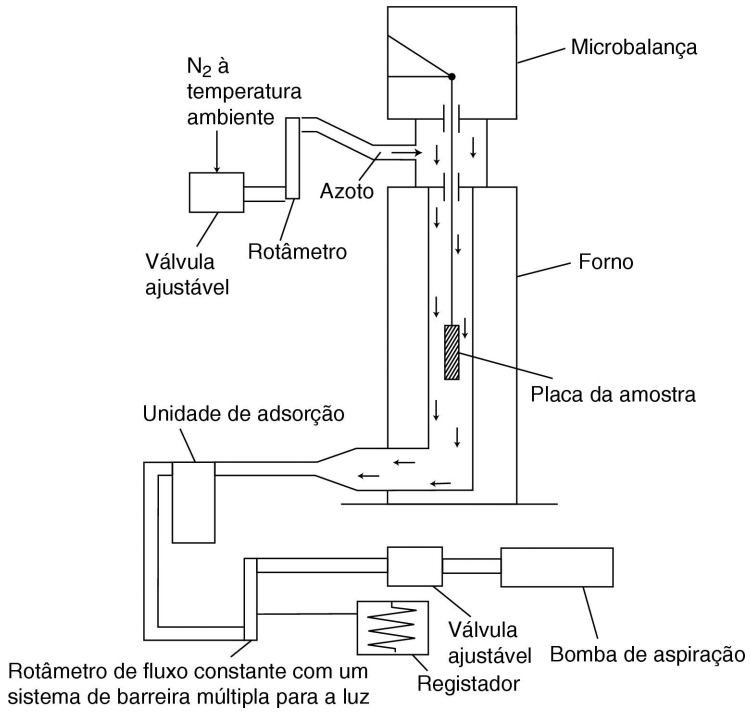
1.5.6.1. *Princípio*

O método baseia-se na determinação das velocidades de evaporação aceleradas das substâncias em estudo a alta temperatura e à pressão ambiente, utilizando a termogravimetria (10)(15)(16)(17)(18)(19)(20). As velocidades de evaporação v_T são calculadas expondo o composto seleccionado a um fluxo atmosférico lento de gás inerte e procedendo ao seguimento da diminuição do seu peso a temperaturas isotérmicas pré-determinadas T, em Kelvin, ao longo de um período adequado. As pressões de vapor p_T são calculadas a partir dos valores de v_T, aplicando a relação linear entre o logaritmo da pressão de vapor e o logaritmo da velocidade de evaporação. Se necessário, pode proceder-se a uma extrapolação para as temperaturas de 20 e de 25 °C, por análise da regressão de log p_T vs. 1/T. Este método é adequado para substâncias a pressões de vapor tão baixas quanto 10^{-10} Pa (10^{-12} mbar) e com um grau de pureza tão próximo quanto possível de 100 %, de modo a evitar a incorrecta interpretação da diminuição de peso constatada.

1.5.6.2. *Equipamento*

O princípio geral do aparelho experimental é apresentado na figura 7.

Figura 7



A placa de suporte com a amostra, pendurada de uma microbalança no interior de uma câmara a temperatura controlada, é sujeita a um fluxo de azoto seco, que transporta consigo as moléculas vaporizadas da substância em estudo. Depois de sair da câmara, o fluxo de gás é purificado numa unidade de adsorção.

1.5.6.3. *Procedimento*

A substância em estudo é aplicada sobre a superfície de uma placa de vidro rugoso, numa camada homogénea. No caso dos sólidos, a placa é molhada de forma uniforme numa solução da substância, utilizando um solvente adequado, e seca em atmosfera inerte. Para a medição, a placa revestida é pendurada no analisador termogravimétrico e a subsequente diminuição do seu peso é medida em contínuo, em função do tempo.

▼M1

A velocidade de evaporação v_T a uma determinada temperatura é calculada a partir da perda de peso Δm da placa com a amostra através da seguinte equação:

$$v_T = \frac{\Delta m}{F \cdot t} \left(g cm^{-2} h^{-1} \right)$$

onde F é a área do revestimento da substância em estudo, que normalmente corresponde à área da própria placa, e t é o tempo ao longo do qual se verificou a perda de peso Δm.

A pressão de vapor p_T é calculada em função da velocidade de evaporação v_T pela seguinte equação:

$$\text{Log } p_T = C + D \text{ log } v_T$$

onde C e D são constantes específicas do aparelho experimental utilizado, dependentes do diâmetro da câmara de medição e da intensidade do fluxo de gás. Essas constantes têm de ser determinadas uma vez para cada aparelho experimental, através da medição e da regressão de log p_T vs. log v_T para uma série de compostos com pressão de vapor conhecida (11)(21)(22).

A relação entre a pressão de vapor p_T e a temperatura T, em Kelvin, é dada pela seguinte equação:

$$\text{Log } p_T = A + B \ 1/T$$

onde A e B são as constantes obtidas pela regressão de log p_T vs. 1/T. Através desta equação, a pressão de vapor pode ser calculada para qualquer outra temperatura, por extrapolação.

1.5.7. **Método da saturação de gases** (23)

1.5.7.1. *Princípio*

Um gás inerte é passado, à temperatura ambiente e com um caudal conhecido e suficientemente lento para garantir a saturação, através ou sobre uma amostra da substância em estudo. É particularmente importante garantir a saturação da fase gasosa. A substância assim transportada é capturada, normalmente utilizando um adsorvente, e a sua quantidade é determinada. Em alternativa à captura e posterior análise do vapor, podem utilizar-se diversas técnicas analíticas em linha, como por exemplo a cromatografia gasosa, para determinar quantitativamente a quantidade de material transportado. A pressão de vapor é calculada partindo do pressuposto de que as leis dos gases ideais são aplicáveis e de que a pressão total de uma mistura de gases é igual à soma das pressões dos gases componentes da mistura. A pressão parcial da substância em estudo, ou seja, a pressão de vapor, é calculada a partir do volume total conhecido dos gases e do peso do material transportado.

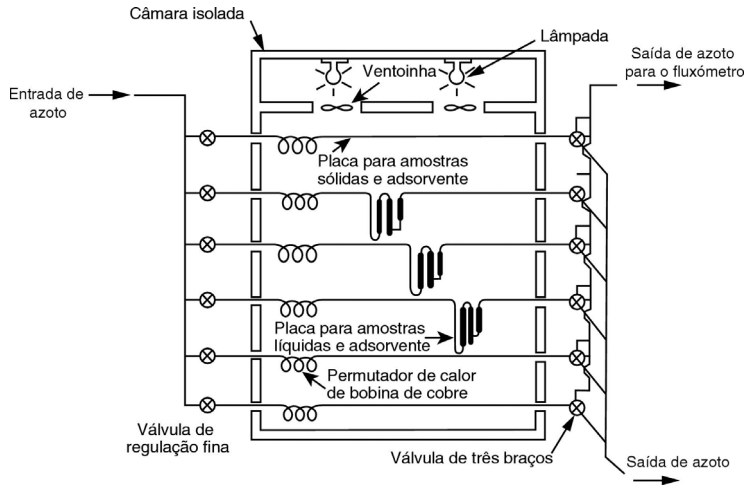
O procedimento de saturação dos gases é aplicável a substâncias químicas líquidas ou sólidas. Pode ser utilizado para pressões de vapor superiores a 10^{-10} Pa (10)(11)(12)(13)(14). O método é mais fiável para as pressões de vapor inferiores a 10^3 Pa. Acima dos 10^3 Pa, as pressões de vapor são geralmente sobrestimadas, provavelmente devido à formação de aerossóis. Na medida em que as medições da pressão de vapor são efectuadas à temperatura ambiente, não é necessário extrapolar dados obtidos a temperaturas mais elevadas, sendo evitado esse passo que pode frequentemente acarretar erros importantes.

1.5.7.2. *Equipamento*

O procedimento exige a utilização de uma câmara a temperatura constante. O esquema da figura 8 mostra uma câmara que contém três placas para amostras sólidas e três câmaras para amostras líquidas, o que permite a análise em triplicado de amostras sólidas ou líquidas. A temperatura é controlada com uma precisão mínima de ± 0,5 °C.

▼**M1**

Figura 8



Normalmente, o gás inerte utilizado como transportador é o azoto, mas por vezes pode ser necessário utilizar outro gás (24). O gás transportador tem de ser seco. O fluxo de gás é dividido em 6 partes, controladas por válvulas de agulha (orifício de aproximadamente 0,79 mm), sendo transportado para a câmara por tubagens de cobre com 3,8 mm de diâmetro interno. Depois de alcançado o equilíbrio térmico, o gás flui pela amostra e pelo colector adsorvente, após o que sai da câmara.

As amostras sólidas são introduzidas em tubos de vidro com diâmetro interno de 5 mm, com rolhas de lã de vidro nas duas extremidades (ver a figura 9). A figura 10 mostra um sistema para amostras líquidas com colector adsorvente. Para a medição da pressão de vapor de líquidos, o método mais reprodutível passa pelo revestimento de esferas de vidro ou de um adsorvente inerte, por exemplo sílica, com o líquido em estudo e pelo enchimento do recipiente com essas esferas. Em alternativa, o gás transportador pode ser passado por uma frita grosseira e borbulhado através de uma coluna da substância líquida em estudo.

Figura 9

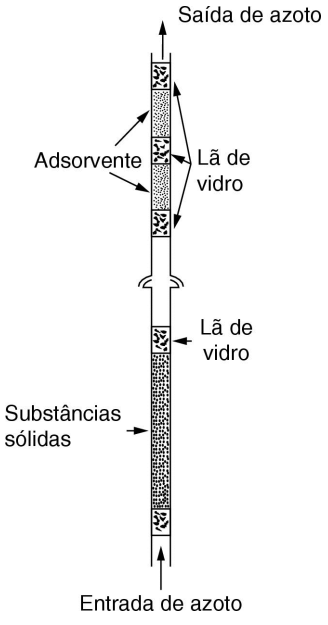
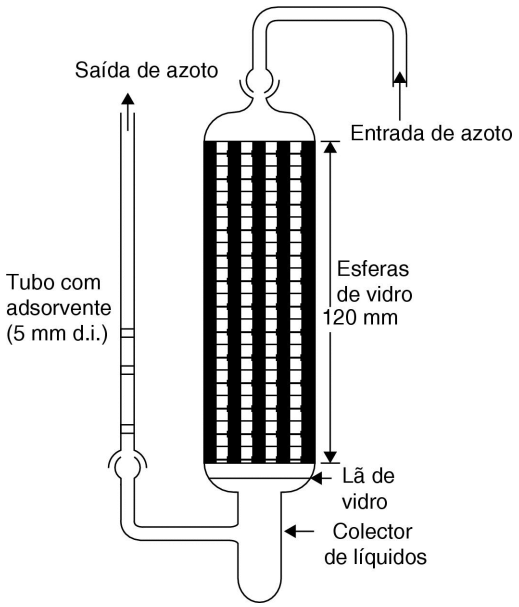


Figura 10



▼M1

O sistema adsorvente inclui duas secções, uma das quais funciona como sistema de apoio (*backup*). Nos casos em que a pressão de vapor seja muito baixa, o adsorvente só irá reter quantidades ínfimas da substância, pelo que a adsorção sobre a lã de vidro e sobre a tubagem de vidro entre a amostra e o adsorvente poderá representar um problema sério.

A utilização de colectores arrefecidos com CO_2 sólido é outra forma eficaz de recolha do material vaporizado. Esse tipo de colectores não provoca retornos de pressão na coluna de saturação, facilitando assim a remoção e quantificação do material recolhido.

1.5.7.3. *Procedimento*

O caudal do gás transportador à saída é medido à temperatura ambiente. O caudal deve ser verificado frequentemente durante a realização da experiência, de forma a garantir que se obtém um valor preciso para o volume total de gás transportador. O ideal é proceder à medição em contínuo, utilizando um fluxómetro mássico. A saturação da fase gasosa pode exigir um tempo de contacto considerável, o que implica a utilização de fluxos bastante baixos (25).

No final da experiência, as duas secções adsorventes (principal e de apoio) são analisadas separadamente. O componente adsorvido em cada secção é retirado por adição de um solvente. As soluções resultantes são sujeitas a análise quantitativa, de forma a determinar o peso total dessorvido em cada secção. A escolha do método analítico (tal como a escolha do adsorvente e do solvente utilizado para a dessorção) será ditada pela natureza do material em estudo. A eficiência da dessorção é determinada injectando uma quantidade conhecida de amostra no adsorvente e procedendo depois à sua dessorção e à análise da quantidade recuperada. É importante que a eficiência da dessorção seja verificada para uma concentração idêntica ou semelhante à da amostra, em condições de ensaio.

Para garantir a saturação do gás transportador com a substância em estudo, são utilizados três caudais diferentes de gás. Se a pressão de vapor calculada não se mostrar dependente do caudal utilizado, presume-se que o gás está saturado.

A pressão de vapor é calculada pela seguinte equação:

$$p = \frac{W}{V} \times \frac{RT}{M}$$

onde:

p = pressão de vapor (Pa)

W = massa da substância em estudo evaporada (g)

V = volume de gás saturado (m^3)

R = constante universal dos gases perfeitos 8,314 ($J\ mol^{-1}\ K^{-1}$)

T = temperatura (K)

M = massa molar da substância em estudo ($g\ mol^{-1}$)

Os volumes medidos devem ser corrigidos para tomar em conta as diferenças de pressão e de temperatura entre o fluxómetro e o saturador.

▼M1

1.5.8. **Método de rotação**

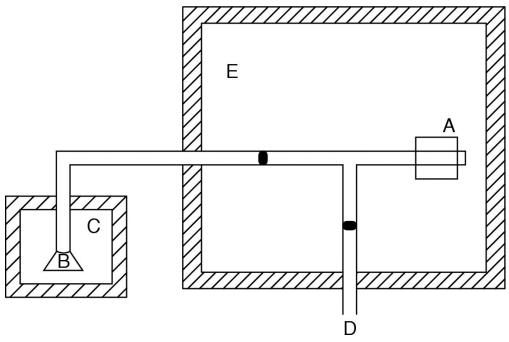
1.5.8.1. *Princípio*

Este método utiliza uma sonda de viscosidade rotativa, na qual o elemento de medição é uma pequena esfera de aço que é suspensa num campo magnético e forçada a rodar por campos rotativos (26)(27)(28). A velocidade de rotação é medida por bobinas de captação. Quando a esfera atinge uma determinada velocidade de rotação, normalmente cerca de 400 rotações por segundo, interrompe-se o fornecimento de energia e dá-se uma desaceleração devida ao atrito com o gás. A diminuição da velocidade de rotação em função do tempo é medida. A pressão de vapor é deduzida a partir da desaceleração da esfera de aço, que depende da pressão. A gama recomendada é de 10^{-4} a 0,5 Pa.

1.5.8.2. *Equipamento*

A figura 11 representa esquematicamente o aparelho experimental. O sensor de medição é colocado numa câmara a temperatura constante, regulada com uma precisão mínima de 0,1 °C. A célula com a amostra é colocada noutra câmara, com a temperatura igualmente regulada com uma precisão mínima de 0,1 °C. As restantes partes do aparelho experimental são mantidas a uma temperatura superior, para evitar a condensação. O aparelho é ligado a um sistema de alto vácuo.

Figura 11



A: Sensor de medição
B: Célula com a amostra
C: Termóstato
D: Linha de vácuo (bomba turbo)
E: Termóstato atmosférico

2. **DADOS E RELATÓRIOS**

2.1. DADOS

Qualquer que seja o método escolhido, a pressão do vapor deve ser determinada pelo menos a duas temperaturas. É preferível proceder à determinação para três ou mais valores de temperatura entre 0 e 50 °C, para verificar a linearidade da curva de pressão de vapor. No caso do método de efusão (célula de Knudsen e termogravimetria isotérmica) e do método de saturação dos gases, recomenda-se a utilização da gama de temperaturas de 120 a 150 °C, em vez da gama de 0 a 50 °C.

2.2. RELATÓRIO DO ENSAIO

O relatório do ensaio deve incluir as seguintes informações:

— método utilizado,

▼M1

— especificação exacta da substância (identificação e impurezas) e passos prévios de purificação, se for caso disso,

— são necessários pelo menos dois — e de preferência três ou mais — valores de pressão de vapor e de temperatura na gama de 0 a 50 °C (ou de 120 a 150 °C),

— pelo menos uma das temperaturas deverá ser igual ou inferior a 25 °C, se tal for tecnicamente possível em função do método de ensaio escolhido,

— todos os dados originais,

— a curva de log p em função de 1/T,

— uma estimativa da pressão de vapor a 20 ou a 25 °C.

Caso se observe um fenómeno de transição (mudança de estado, decomposição), deverá ser acrescentada a seguinte informação:

— natureza da alteração,

— temperatura à qual ocorre a alteração, à pressão atmosférica,

— pressão de vapor a 10 e a 20 °C abaixo da temperatura de transição, bem como a 10 C e a 20 °C acima dessa temperatura (excepto no caso de passagem do estado sólido ao estado gasoso).

Devem ser fornecidas todas as informações e observações de interesse para a interpretação dos resultados, nomeadamente no que se refere às impurezas e ao estado físico da substância.

3. **BIBLIOGRAFIA**

(1) *Jornal Oficial das Comunidades Europeias* L 383 A, 26-47 (1992).

(2) Ambrose, D. (1975). Experimental Thermodynamics, Vol. II, Le Neindre, B., e Vodar, B., Eds., Butterworths, Londres.

(3) Weissberger R., ed. (1959). Technique of organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Interscience Publ., Nova Iorque, 1959, vol. I, parte I, capítulo IX.

(4) Glasstone, S. (1946). Textbook of Physical Chemistry, 2nd ed., Van Nostrand Company, Nova Iorque.

(5) NF T 20-048 AFNOR (Setembro de 1985). Chemical products for industrial use — Determination of vapour pressure of solids and liquids within range from 10^{-1} to 10^{5} Pa — Static method.

(6) ASTM D 2879-86, Standard test method for vapour pressure — temperature relationship and initial decomposition temperature of liquids by isoteniscope.

(7) NF T 20-047 AFNOR (Setembro de 1985). Chemical products for industrial use — Determination of vapour pressure of solids and liquids within range from 10^{-3} to 1 Pa — Vapour pressure balance method.

▼**M1**

(8) Knudsen, M. (1909). Ann. Phys. Lpz., 29, 1979; (1911), 34, 593.

(9) Ambrose, D., Lawrenson, I.J., Sprake, C.H.S. (1975). J. Chem. Thermodynamics 7, 1173.

(10) Schmuckler, M.E., Barefoot, A.C., Kleier, D.A., Cobranchi, D.P. (2000), Vapor pressures of sulfonylurea herbicides; Pest Management Science 56, 521-532.

(11) Tomlin, C.D.S. (ed.), The Pesticide Manual, Twelfth Edition (2000).

(12) Friedrich, K., Stammbach, K., Gas chromatographic determination of small vapour pressures determination of the vapour pressures of some triazine herbicides. J. Chromatog. 16 (1964), 22-28.

(13) Grayson, B.T., Fosbraey, L.A., Pesticide Science 16 (1982), 269-278.

(14) Rordorf, B.F., Prediction of vapor pressures, boiling points and enthalpies of fusion for twenty-nine halogenated dibenzo-p-dioxins, Thermochimia Acta 112 Issue 1 (1987), 117-122.

(15) Gückel, W., Synnatschke, G., Ritttig, R., A Method for Determining the Volatility of Active Ingredients Used in Plant Protection; Pesticide Science 4 (1973) 137-147.

(16) Gückel, W., Synnatschke, G., Ritttig, R., A Method for Determining the Volatility of Active Ingredients Used in Plant Protection II. Application to Formulated Products; Pesticide Science 5 (1974) 393-400.

(17) Gückel, W., Kaestel, R., Lewerenz, J., Synnatschke, G., A Method for Determining the Volatility of Active Ingredients Used in Plant Protection. Part III: The Temperature Relationship between Vapour Pressure and Evaporation Rate; Pesticide Science 13 (1982) 161-168.

(18) Gückel, W., Kaestel, R., Kroehl, T., Parg, A., Methods for Determining the Vapour Pressure of Active Ingredients Used in Crop Protection. Part IV: An Improved Thermogravimetric Determination Based on Evaporation Rate; Pesticide Science 45 (1995) 27-31.

(19) Kroehl, T., Kaestel, R., Koenig, W., Ziegler, H., Koehle, H., Parg, A., Methods for Determining the Vapour Pressure of Active Ingredients Used in Crop Protection. Part V: Thermogravimetry Combined with Solid Phase MicroExtraction (SPME); Pesticide Science, 53 (1998) 300-310.

(20) Tesconi, M., Yalkowsky, S.H., A Novel Thermogravimetric Method for Estimating the Saturated Vapor Pressure of Low-Volatility Compounds; Journal of Pharmaceutical Science 87(12) (1998) 1512-20.

(21) Lide, D.R. (ed.), CRC Handbook of Chemistry and Physics, 81th ed.(2000), Vapour Pressure in the Range -25 °C to 150 °C.

(22) Meister, R.T. (ed.), Farm Chemicals Handbook, Vol. 88 (2002).

(23) 40 CFR, 796. (1993). pp 148-153, Office of the Federal Register, Washington DC.

▼**M1**

(24) Rordorf B.F. (1985). Thermochimica Acta 85, 435.

(25) Westcott et al. (1981). Environ. Sci. Technol. 15, 1375.

(26) Messer G., Röhl, P., Grosse G., and Jitschin W. (1987). J. Vac. Sci. Technol. (A), 5(4), 2440.

(27) Comsa G., Fremerey J.K., and Lindenau, B. (1980). J. Vac. Sci. Technol. 17(2), 642.

(28) Fremerey, J.K. (1985). J. Vac. Sci. Technol. (A), 3(3), 1715.

▼M1

Apêndice

Método de estimação

INTRODUÇÃO

Um valor estimado da pressão de vapor pode ser utilizado para:

— decidir qual o método experimental mais apropriado,

— apresentar uma estimativa ou um valor limite para os casos em que os métodos experimentais não podem ser aplicados por razões técnicas.

MÉTODO DE ESTIMAÇÃO

A pressão de vapor de líquidos e de sólidos pode ser estimada utilizando a correlação de Watson modificada (a). O único dado experimental necessário é o ponto de ebulição normal. O método é aplicável na gama de pressões entre 10^5 Pa e 10^{-5} Pa.

Para mais informações sobre o método, consultar o «Handbook of Chemical Property Estimation Methods» (b). Ver igualmente a Environmental Monograph n.º 67 (c) da OCDE.

PROCEDIMENTO DE CÁLCULO

A pressão de vapor é calculada do seguinte modo:

$$\ln P_{vp} \approx \frac{\Delta H_{vb}}{\Delta Z_b R T_b}\left[1 - \frac{\left(3 - 2\frac{T}{T_b}\right)^m}{\frac{T}{T_b}} - 2m\left(3 - 2\frac{T}{T_b}\right)^{m-1} \ln \frac{T}{T_b}\right]$$

onde:

T = temperatura de interesse

T_b = ponto de ebulição normal

P_{VP} = pressão de vapor à temperatura T

ΔH_{Vb} = calor de vaporização

ΔZ_b = factor de compressibilidade (estimado em 0,97)

m = factor empírico, dependente do estado físico à temperatura de interesse

Para além do que,

$$\frac{\Delta H_{vb}}{T_b} = K_F\ (8{,}75 + R \ln T_b)$$

onde K_F é um factor empírico que permite tomar em consideração a polaridade da substância. Os factores K_F estão listados, para diferentes tipos de compostos, na referência bibliográfica (b).

▼**M1**

É bastante frequente que existam dados disponíveis que apresentam os pontos de fusão a pressões reduzidas. Nesses casos, a pressão de vapor é calculada do seguinte modo:

$$\ln P_{vp} \approx \ln P_1 + \frac{\Delta H_{vl}}{\Delta Z_b R T_l}\left[1 - \left(3 - 2\,\frac{T}{T_1}\right)^m \frac{T_1}{T} - 2m\left(3 - 2\,\frac{T}{T_1}\right)^{m-1} \ln \frac{T}{T_1}\right]$$

onde T_1 é o ponto de ebulição à pressão reduzida P_1.

RELATÓRIO

Quando for utilizado o método de estimativa, o respectivo relatório incluirá uma documentação exaustiva do método de cálculo utilizado.

BIBLIOGRAFIA

(a) Watson, K.M. (1943). Ind. Eng. Chem, 35, 398.

(b) Lyman, W.J., Reehl, W.F., Rosenblatt, D.H. (1982). Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill.

(c) OCDE Environmental Monograph N.º 67. Application of Structure-Activity Relationships to the Estimation of Properties Important in Exposure Assessment (1993).

▼B

A.5. TENSÃO SUPERFICIAL

1. MÉTODO

Os métodos descritos baseiam-se nas normas de ensaio da OCDE (1). Os princípios fundamentais encontram-se descritos na referência (2).

1.1. INTRODUÇÃO

Os métodos descritos são aplicáveis à medição da tensão superficial em soluções aquosas.

Considera-se útil possuir informações preliminares sobre a substância, relativamente a: solubilidade em água, estrutura, propriedades relativas à hidrólise e concentração crítica de formação de micelas, antes de se efectuarem estes testes.

Os métodos que se seguem são aplicáveis à maior parte das substâncias químicas, sem qualquer restrição no que diz respeito ao seu grau de pureza.

A medição da tensão superficial pelo método do tensiómetro de anel é aplicável apenas a soluções aquosas com uma viscosidade dinâmica inferior a cerca de 200 mPa s.

1.2. DEFINIÇÕES E UNIDADES

Define-se como tensão superficial a entalpia superficial livre, por unidade de área da superfície.

A tensão superficial é dada por:

N/m (unidade do SI) ou

mN/m (subunidade do SI)

1 N/m = 10^3 dines/cm

1 mN/m = 1 dine/cm no antigo e obsoleto sistema cgs

1.3. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

Não é necessário utilizar substâncias de referência quando se está a investigar uma nova substância. Essas substâncias servem essencialmente para verificar, de vez em quando, a calibração do método e para proporcionar a comparação com resultados obtidos com outros métodos.

As substâncias de referência que abrangem um intervalo amplo de tensões superficiais encontram-se enumeradas nas referências (1) e (3).

1.4. PRINCÍPIO DOS MÉTODOS

Os métodos baseiam-se na medição da força máxima que é necessário exercer verticalmente sobre um colchete ou anel em contacto com a superfície do líquido que se pretende examinar colocado num recipiente, no sentido de o separar dessa superfície, ou sobre uma placa, com uma aresta em contacto com a superfície, no sentido de se remover a película que se formou.

As substâncias solúveis em água pelo menos para valores de concentração de 1 mg/l são testadas em solução aquosa para um valor único de concentração.

1.5. CRITÉRIOS DE QUALIDADE

Estes métodos são susceptíveis de proporcionar maior precisão do que a eventualmente necessária para a avaliação ambiental.

▼B

1.6. DESCRIÇÃO DOS MÉTODOS

Prepara-se uma solução da substância em água destilada. A concentração desta solução deve atingir 90 % do valor da solubilidade de saturação da substância em água; no caso de esta concentração exceder o valor de 1 g/l, utiliza-se para os testes a concentração de 1 g/l. Não é necessário testar as substâncias cujo valor de solubilidade em água seja inferior a 1 mg/l.

1.6.1. **Método da placa**

Ver ISO 304 e NF T 73-060 (agentes tensioactivos: determinação da tensão superficial por remoção de películas líquidas).

1.6.2. **Método do colchete**

Ver ISO 304 e NF T 73-060 (agentes tensioactivos: determinação da tensão superficial por remoção de películas líquidas).

1.6.3. **Método do anel**

Ver ISO 304 e NF T 73-060 (agentes tensioactivos: determinação da tensão superficial por remoção de películas líquidas).

1.6.4. **Método do anel harmonizado pela OCDE**

1.6.4.1. *Aparelho*

Os tensiómetros comercialmente disponíveis são adequados para esta medição. São constituídos pelos elementos seguintes:

— mesa de amostra móvel,

— sistema de medição de força,

— corpo para medição (anel),

— recipiente de medição.

1.6.4.1.1. Mesa de amostra móvel

Utiliza-se a mesa de amostra móvel como suporte para o recipiente de medição de temperatura controlada que contém o líquido que se pretende testar. A sua montagem faz-se num suporte em conjunto com o sistema de medição de força.

1.6.4.1.2. Sistema de medição de força

O sistema de medição de força (ver figura) fica colocado sobre a mesa da amostra. O erro de medição de força não deverá exceder $\pm 10^{-6}$ N, correspondente a um erro limite de ± 0,1 mg numa medição de massa. Em muitos casos, a escala dos tensiómetros comercialmente disponíveis é calibrada em mN/m, de modo que a tensão superficial pode ser lida directamente em mN/m, com uma precisão de 0,1 mN/m.

▼B

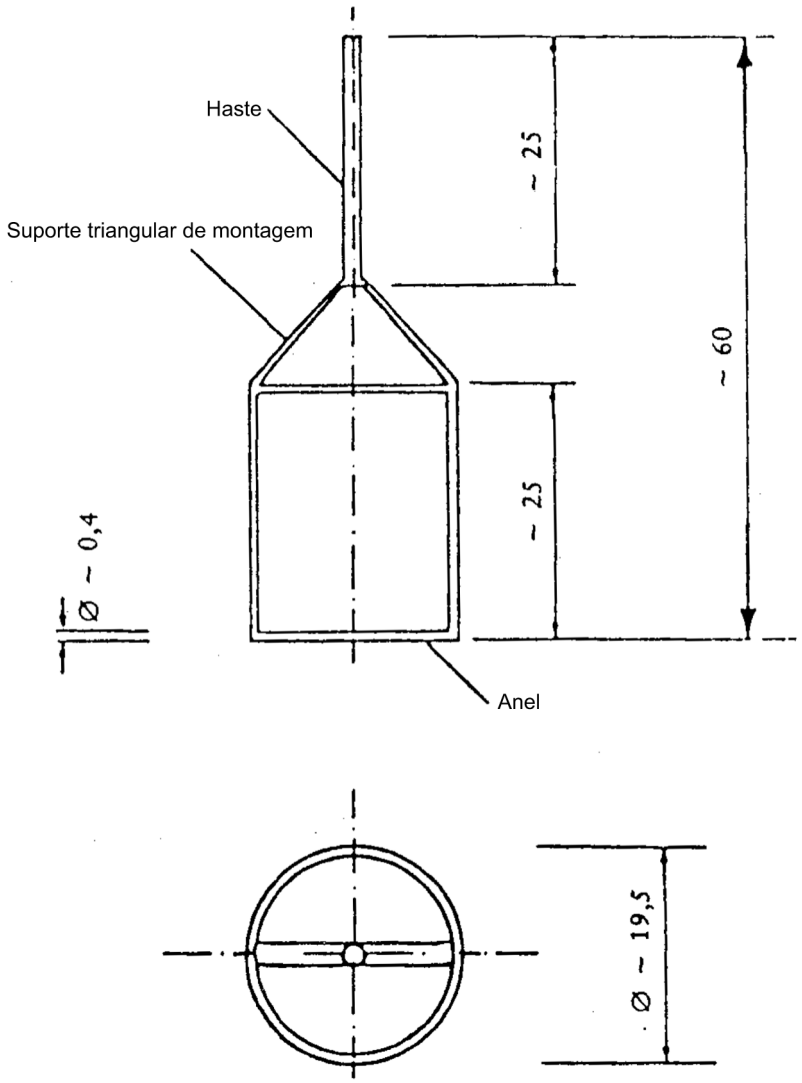
1.6.4.1.3. Corpo para a medição (anel)

Normalmente o anel é feito de um fio de platina/irídio com a espessura aproximada de 0,4 mm e com um perímetro médio de 60 mm. O anel é suspenso horizontalmente de uma haste metálica, através de um suporte triangular de montagem, que estabelece a ligação ao sistema de medição de força (ver figura).

Figura

Corpo para a medição

(Todas as dimensões estão expressas em milímetros)



1.6.4.1.4. Recipiente de medição

O recipiente de medição que contém a solução a testar deverá ser um recipiente de vidro termostatizado. Deve ser concebido de tal modo que durante a medição a temperatura da solução líquida que se pretende testar e a fase gasosa sobre a sua superfície permaneçam constantes e impedindo que haja evaporação da amostra. São aceitáveis recipientes cilíndricos de vidro que possuam um diâmetro interno não inferior a 45 mm.

▼B

1.6.4.2. *Preparação do equipamento*

1.6.4.2.1. Limpeza

Os recipientes de vidro devem ser cuidadosamente limpos. Se necessário, deverão ser lavados com ácido cromossulfúrico quente e depois lavados com ácido fosfórico xaroposo (83 a 98 % em peso de H_3PO_4), lavados muito bem com água da torneira e lavados finalmente com água bidestilada até se obter uma reacção neutra, efectuando-se depois a secagem ou a lavagem com um pouco do líquido da amostra que se pretende medir.

O anel deve ser primeiro muito bem lavado com água para se fazer a remoção de quaisquer substâncias que sejam solúveis em água, depois mergulhado rapidamente em ácido cromossulfúrico, lavado com água bidestilada até se obter uma reacção neutra e finalmente deverá ser aquecido rapidamente sobre uma chama de metanol.

Nota:

A contaminação com substâncias que não sejam dissolvidas ou destruídas com o ácido cromossulfúrico ou com o ácido fosfórico, tais como os silicones, deve ser removida usando um solvente orgânico adequado.

1.6.4.2.2. Calibração do aparelho

A validação do aparelho consiste em verificar o seu zero e em ajustá-lo de tal modo que a indicação do instrumento permita uma determinação segura em mN/m.

Montagem:

O aparelho deve ser nivelado, por exemplo, por meio de um nível de bolha de ar colocado na base do tensiómetro, ajustando-se os parafusos de nivelamento existentes na base.

Ajustamento do zero:

Após a montagem do anel no aparelho e antes da imersão no líquido deve ajustar-se o zero do tensiómetro e deve verificar-se o paralelismo do anel com a superfície do líquido. Para satisfazer este objectivo pode utilizar-se como espelho a superfície do líquido.

Calibrações:

A calibração pode ser efectuada recorrendo a um de dois procedimentos:

a) Utilizando uma massa: procedimento que utiliza cavaleiros de massa conhecida compreendida entre 0,1 e 1,0 g colocados sobre o anel. O factor de calibração Φ_a pelo qual todas as leituras do instrumento devem ser multiplicadas determina-se de acordo com a equação (1):

$$\Phi_a = \frac{\sigma_r}{\sigma_a} \qquad (1)$$

em que:

$$\sigma_r = \frac{mg}{2b} \text{ (mN/m)}$$

m = massa do cavaleiro (g)

g = aceleração da gravidade (981 cm s^{-2} ao nível do mar)

b = perímetro médio do anel (cm)

σ_a = leitura do tensiómetro após colocação do cavaleiro no anel (mN/m)

▼B

b) Utilizando água: procedimento que utiliza água pura cuja tensão superficial, por exemplo, à temperatura de 23°C é igual a 72,3 mN/m. Este procedimento é mais rápido do que a calibração com cavaleiros, mas existe sempre o risco de a tensão superficial da água estar falseada por vestígios de contaminação com agentes tensioactivos.

O factor de calibração Φ_b pelo qual todas as indicações do instrumento deverão ser multiplicadas determina-se de acordo com a equação (2):

$$\Phi_b = \frac{\sigma_o}{\sigma_g} \qquad (2)$$

em que:

σ_o = valor referido na literatura para a tensão superficial da água (mN/m)

σ_g = valor medido da tensão superficial da água (mN/m) ambos à mesma temperatura.

1.6.4.3. *Preparação de amostras*

As soluções aquosas deverão ser preparadas com as substâncias que se pretende testar, utilizando as necessárias concentrações em água, e não deverão conter quaisquer substâncias não dissolvidas.

A solução deve ser mantida a uma temperatura constante (± 0,5°C). Uma vez que a tensão superficial de uma solução no recipiente de medição se altera no decurso do tempo, deverão ser efectuadas diversas medições em momentos diferentes e deverá ser traçada uma curva que represente a tensão superficial em função do tempo. Quando já não ocorrerem mais variações significa que se atingiu um estado de equilíbrio.

A contaminação com poeiras e com gases interfere com a medição. Em consequência, o trabalho deverá ser efectuado sob uma cobertura de protecção.

1.6.5. **Condições do teste**

A medição deverá ser efectuada aproximadamente à temperatura de 20 °C e deverá ser controlada entre ± 0,5°C.

1.6.6. **Realização do teste**

As soluções que se pretendem medir devem ser cuidadosamente transferidas para o recipiente de medição, limpo, tomando-se precauções para evitar a formação de espuma, e depois o recipiente de medida deverá ser colocado sobre a mesa do aparelho de teste. A parte superior da mesa com o recipiente de medida deverá ser elevada até que o anel fique imerso sob a superfície da solução que se pretende medir. Depois, a parte superior da mesa deverá ser baixada gradual e uniformemente (aproximadamente a velocidade de 0,5 cm/ /minuto) até que ocorra a separação do anel da superfície no momento em que se atingiu a força máxima. A camada de líquido associada ao anel não deve separar-se do anel. Depois de se terem completado as medições deve imergir-se o anel novamente sob a superfície e devem repetir-se as medições até se atingir um valor constante para a tensão superficial. O momento da transferência da solução para o recipiente de medição deverá ser registado para cada determinação. Deverão ser efectuadas leituras da força máxima necessária para separar o anel da superfície do líquido.

▼B

2. **RESULTADOS**

Para se calcular a tensão superficial, o valor lido em mN/m no aparelho deverá ser multiplicado primeiro pelo factor de calibração Φ_a ou Φ_b (conforme o procedimento de calibração utilizado). Obter-se-á deste modo um valor aproximado, pelo que é necessária correcção posterior.

Harkins e Jordan (4) determinaram empiricamente factores de correcção para valores de tensão superficial medidos pelo método do anel, os quais dependem das dimensões do anel, da densidade do líquido e da sua tensão superficial.

Uma vez que é trabalhoso determinar o factor de correcção para cada medição individual a partir das tabelas de Harkins e Jordan, para se calcular a tensão superficial de soluções aquosas pode utilizar-se o procedimento simplificado de leitura dos valores de tensão superficial corrigidos directamente a partir da tabela. (Recorrer-se-á à interpolação para leituras compreendidas entre os valores indicados na tabela.)

Tabela

Correcção da tensão superficial medida

Apenas para soluções aquosas, p = 1 g/cm^3

R	9,55 mm (raio médio do anel)
r	0,185 mm (raio do fio do anel)

Valor experimental (mN/m)	Valor corrigido (mN/m)	
	Calibração de massa [ver 1.6.4.2.2. a)]	Calibração com água [ver 1.6.4.2.2. b)]
20	16,9	18,1
22	18,7	20,1
24	20,6	22,1
26	22,4	24,1
28	24,3	26,1
30	26,2	28,1
32	28,1	30,1
34	29,9	32,1
36	31,8	34,1
38	33,7	36,1
40	35,6	38,2
42	37,6	40,3
44	39,5	42,3
46	41,4	44,4
48	43,4	46,5
50	45,3	48,6
52	47,3	50,7
54	49,3	52,8
56	51,2	54,9

▼B

Valor experimental (mN/m)	Valor corrigido (mN/m)	
	Calibração de massa [ver 1.6.4.2.2. a)]	Calibração com água [ver 1.6.4.2.2. b)]
58	53,2	57,0
60	55,2	59,1
62	57,2	61,3
64	59,2	63,4
66	61,2	65,5
68	63,2	67,7
70	65,2	69,9
72	67,2	72,0
74	69,2	—
76	71,2	—
78	73,2	—

Este quadro foi compilado com base na correcção de Harkins-Jordan e é idêntico ao da norma DIN (DIN 53914) para a água e para soluções aquosas (densidade p = 1 g/cm^3 e destina-se a um anel comercialmente disponível que possui as dimensões R = 9,55 mm (raio médio do anel) e r = 0,185 mm (raio do fio do anel). A tabela proporciona valores corrigidos para as medições de tensão superficial obtidas após calibração com massas ou calibração com água.

Em alternativa, sem que haja a calibração precedente, pode calcular-se a tensão superficial de acordo com a fórmula seguinte:

$$\sigma = \frac{f \times F}{4\pi R}$$

em que:

F = força medida no dinamómetro no ponto de ruptura da película

R = raio do anel

f = factor de correcção (1)

3. **RELATÓRIO**

3.1. RELATÓRIO DO ENSAIO

O relatório do ensaio deverá conter, se possível, a informação seguinte:

— método utilizado,

— tipo de água ou de solução utilizada,

— especificação exacta da substância (identificação e impurezas),

— resultados da medição: tensão superficial (leitura) especificando as duas leituras individuais e a sua média aritmética e bem assim o valor médio corrigido (tomando em consideração o factor relativo ao equipamento e a tabela de correcção,

▼B

— concentração da solução,

— temperatura do teste,

— período de vida da solução utilizada; em particular, o tempo decorrido entre a preparação e a medição efectuada na solução,

— descrição da dependência temporal da tensão superficial após a transferência da solução para o recipiente de medição,

— todas as informações e notas relevantes para a interpretação dos resultados devem ser descritas, especialmente no que diz respeito a impurezas e estado físico da substância.

3.2. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Considerando que a água destilada possui uma tensão superficial de 72,75 mN/m à temperatura de 20°C, as substâncias que apresentem uma tensão superficial inferior a 60 mN/m sob as condições descritas para este método deverão ser consideradas como materiais tensioactivos.

4. **REFERÊNCIAS**

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 115, Decision of the Council C(81) 30 final.

(2) R. Weissberger ed., Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Interscience Publ., New York, 1959, vol. I, Part I, Chapter XIV.

(3) Pure Appl. Chem., 1976, vol. 48, p. 511.

(4) Harkins, W.D., Jordan, H.F., J. Amer. Chem. Soc., 1930, vol. 52, p. 1751.

▼M4

A.6. **SOLUBILIDADE EM ÁGUA**

INTRODUÇÃO

1. Este método é equivalente ao *Test Guideline* TG 105 (1995) da OCDE, constituindo uma versão revista do TG 105 inicialmente adotado em 1981. Não há diferenças substanciais entre a versão atual e a de 1981, sendo as principais diferenças ao nível da apresentação. A revisão baseou-se no método de ensaio "Solubilidade em água" da UE (1).

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

2. A hidrossolubilidade das substâncias pode ser consideravelmente afetada pela presença de impurezas. Este método serve para determinar a hidrossolubilidade de substâncias essencialmente puras, estáveis na água e não voláteis. Antes de determinar a hidrossolubilidade, é útil dispor de alguns elementos prévios sobre a substância em estudo, tais como a fórmula estrutural, a pressão de vapor, a constante de dissociação e a hidrólise em função do pH.

3. São descritos neste método de ensaio dois métodos distintos, que se destinam a solubilidades respetivamente inferiores e superiores a 10^{-2} g/l: o método de eluição em coluna e o método do balão. É descrito igualmente um ensaio preliminar, que permite determinar a quantidade aproximada de amostra adequada para o ensaio final, bem como o tempo necessário para a saturação.

DEFINIÇÕES E UNIDADES

4. A hidrossolubilidade de uma substância é a concentração mássica de saturação da substância em água a uma dada temperatura.

5. A hidrossolubilidade exprime-se em massa de soluto por volume de solução. A unidade SI é o kg/m^3, mas também pode utilizar-se o g/l.

PRODUTOS QUÍMICOS DE REFERÊNCIA

6. Não é necessário utilizar produtos químicos de referência para estudar substâncias por este método.

DESCRIÇÃO DOS MÉTODOS

Condições de realização dos ensaios

7. Os ensaios realizam-se, de preferência, à temperatura de 20 °C ± 0,5 °C. Deve manter-se a temperatura escolhida constante em todas as partes importantes do equipamento.

Ensaio preliminar

8. Numa proveta graduada de 10 ml com tampa de vidro, adicionam-se sucessivamente volumes crescentes de água, à temperatura ambiente, a aproximadamente 0,1 g de amostra (é necessário pulverizar as substâncias sólidas). Após cada adição de água, agita-se a mistura durante 10 minutos e verifica-se visualmente se resta amostra por dissolver. Se, após a adição de 10 ml de água, a amostra ou parte dela ainda não se tiver dissolvido, prossegue-se a experiência numa proveta graduada de 100 ml. A solubilidade

▼M4

aproximada é dada na tabela 1, por debaixo do volume de água que solubiliza completamente a amostra. Quando a solubilidade é baixa, o tempo necessário para dissolver a substância em estudo pode ser longo, devendo aguardar-se pelo menos 24 horas. Se, após 24 horas, a substância em estudo ainda não se tiver dissolvido, deve esperar-se mais tempo (até 96 horas) ou experimentar-se uma diluição maior, para verificar se deve utilizar-se o método de eluição em coluna ou o método do balão.

Quadro 1

Volume de água (ml) no qual se dissolve 0,1 g de amostra	0,1	0,5	1	2	10	100	> 100
Solubilidade aproximada (g/l)	> 1 000	1 000-200	200-100	100-50	50-10	10-1	< 1

Método de eluição em coluna

Princípio

9. Este método baseia-se na eluição da substância em estudo com água numa microcoluna carregada com um material de enchimento inerte previamente revestido com um excesso da substância (2). A hidrossolubilidade é dada pela concentração mássica do eluído depois de atingido um patamar em função do tempo.

Material e aparelhagem

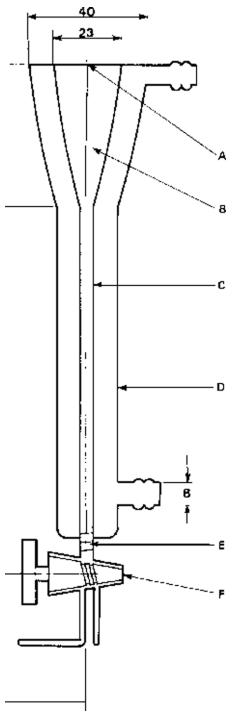
10. É necessária uma microcoluna (figura 1) mantida a temperatura constante, ligada a uma bomba de recirculação (figura 2) ou a um reservatório de nível (figura 3). O enchimento inerte que a microcoluna contém é mantido no lugar por um pequeno tampão de fibra de vidro, que também serve para reter as partículas presentes. Pode utilizar-se como enchimento esférulas de vidro, terra de diatomáceas ou outros materiais inertes.

11. A microcoluna ilustrada na figura 1 é adequada para funcionar com uma bomba de recirculação. Tem uma parte superior de volume correspondente a cinco vezes o volume do leito (descartado no início do ensaio) mais o volume de cinco amostras (retiradas para análise durante o ensaio). O volume da cabeça da coluna pode ser menor se for possível adicionar água ao sistema durante o ensaio, em substituição do volume inicial removido com as impurezas, equivalente a cinco vezes o volume do leito. Liga-se a coluna com tubagem de material inerte a uma bomba de recirculação capaz de debitar cerca de 25 ml/h. Esta pode ser, por exemplo, uma bomba peristáltica ou uma bomba de membrana. É necessário garantir que o material das tubagens não provoca contaminações nem nele há adsorções.

12. A figura 3 ilustra uma montagem com um reservatório de nível, na qual a microcoluna dispõe de uma torneira de via única. A ligação ao reservatório de nível consiste numa junta de vidro esmerilado e em tubagem de material inerte. O caudal proveniente desse reservatório deve ser de aproximadamente 25 ml/h.

▼**M4**

Figura 1



Dimensões em mm

A. Junta de vidro esmerilado

B. Parte superior

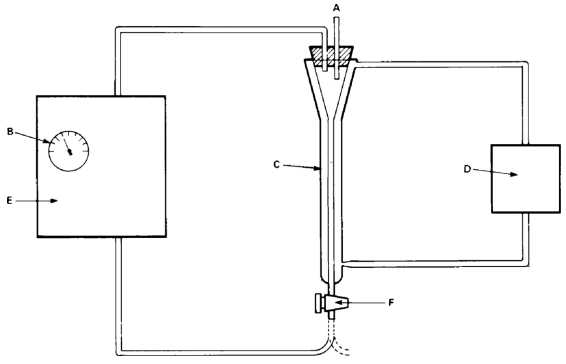
C. Diâmetro interior (5)

D. Diâmetro exterior (19)

E. Tampão de fibra de vidro

F. Torneira

Figura 2



A. Saída para equilíbrio atmosférico

B. Medidor de caudal

C. Microcoluna

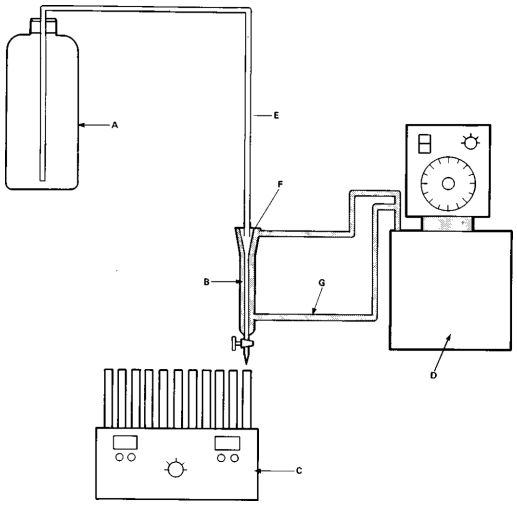
D. Bomba de circulação termostatizada

E. Bomba de recirculação

F. Torneira de duas vias para recolha das amostras

▼M4

Figura 3



A. Reservatório de nível (por exemplo, frasco de reagentes com 2,5 l)

B. Coluna

C. Recetor de frações

D. Termóstato

E. Tubagem de *Teflon*

F. Junta de vidro esmerilado

G. Tubagem de circulação de água (entre o termóstato e a coluna; diâmetro interno: aproximadamente 8 mm)

13. Transfere-se aproximadamente 600 mg de material de enchimento para um balão de fundo redondo de 50 ml. Dissolve-se num solvente volátil de qualidade para análise uma quantidade adequada da substância em estudo e adiciona-se ao material de enchimento uma quantidade adequada desta solução. Evapora-se completamente o solvente, utilizando, por exemplo, um evaporador rotativo. Caso contrário, não se conseguirá manter o enchimento saturado com água durante a eluição, devido a efeitos de partição à superfície. Uma vez impregnado como se descreveu com a substância em estudo, embebe-se o material de enchimento com cerca de 5 ml de água, durante duas horas, e transfere-se a seguir a suspensão para a microcoluna. Em alternativa, pode introduzir-se o material de enchimento, impregnado como se descreveu com a substância em estudo, na microcoluna já com água, deixando depois em repouso durante duas horas para se atingir o equilíbrio.

14. A impregnação do material de enchimento pode causar problemas, gerando resultados errados, por exemplo, se a substância em estudo se depositar como um óleo. Devem examinar-se estes problemas e consignar-se as conclusões no relatório.

Processo com bomba de recirculação

15. Inicia-se o fluxo através da coluna. Recomenda-se um caudal de aproximadamente 25 ml/hora, correspondente a dez vezes o volume do leito da coluna descrita por hora. A fim de eliminar as impurezas solúveis na água, começa-se por rejeitar, pelo menos, um volume correspondente a cinco vezes o volume do leito. Em seguida, deixa-se a bomba de recirculação funcionar até se atingir o equilíbrio, definido pela obtenção de cinco amostras sucessivas cujas concentrações não difiram entre si mais do que ± 30 %, por qualquer ordem. Estas amostras devem estar desfasadas umas das outras de intervalos de tempo correspondentes à passagem de um volume correspondente a, pelo menos, dez vezes o do leito da coluna. Conforme o método de análise utilizado, pode ser preferível traçar uma curva da concentração em função do tempo, para evidenciar o estado de equilíbrio.

▼M4

Processo com reservatório de nível

16. Recolhem-se frações sucessivas de eluído e analisam-se pelo método escolhido. Para determinar a solubilidade utilizam-se frações provenientes da eluição intermédia, na qual as concentrações de, pelo menos, cinco frações consecutivas não diferem umas das outras mais de ± 30 %.

17. O eluente preferível é água bidestilada. Também pode utilizar-se água desionizada de resistividade superior a 10 megaohms/cm e teor total de carbono de origem biológica inferior a 0,01 %.

18. Em ambos os processos, procede-se a uma repetição da sequência descrita com metade do caudal inicial. Se os resultados das duas séries forem coincidentes, considera-se o ensaio satisfatório. Se a solubilidade medida com o caudal menor for superior, reduzir-se-á sucessivamente o caudal a metade, até se obter a mesma solubilidade em duas séries consecutivas.

19. Em ambos os processos, verifica-se se as frações contêm matérias coloidais por observação do efeito de Tyndall. A presença de partículas invalida o ensaio, que deve repetir-se depois de melhorada a ação filtrante da coluna.

20. Mede-se o pH de cada amostra, de preferência com bandas indicadoras próprias.

Método do balão

Princípio

21. Dissolve-se em água a substância em estudo (pulverizada, se for sólida), a uma temperatura ligeiramente superior à do ensaio. Ao atingir-se a saturação, arrefece-se a mistura e mantém-se esta à temperatura de ensaio. Em alternativa, desde que, por meio de uma amostragem adequada, se garanta que o equilíbrio de saturação foi atingido, pode efetuar-se a medição diretamente à temperatura de ensaio. Em seguida, determina-se por um método analítico adequado a concentração mássica da substância em estudo na solução aquosa, a qual não pode conter partículas não dissolvidas (3).

Material e aparelhagem

22. É necessário o seguinte:

— utensílios de vidro e aparelhagem de uso corrente em laboratório,

— dispositivo para agitação das soluções em condições termostáticas,

— se necessário (para emulsões), uma centrifugadora, de preferência termostatizada,

— equipamento de análise.

Procedimento

23. A partir do ensaio preliminar, estima-se a quantidade da substância em estudo necessária para saturar o volume pretendido de água. Pesam-se três porções de aproximadamente cinco vezes essa quantidade em três recipientes de vidro com tampa de vidro (por exemplo, tubos de centrifugação ou balões). Adiciona-se a cada recipiente um volume de água escolhido em função do método analítico e da gama de solubilidades. Tapam-se hermeticamente os recipientes e agitam-se a 30 °C, utilizando um agitador capaz de funcionar a temperatura constante — por exemplo, agitação magnética em banho-maria termostatizado. Decorrido um dia, equilibra-se um dos recipientes durante 24 horas à temperatura de ensaio, agitando de vez em quando. Em seguida, centrifuga-se o conteúdo desse recipiente à temperatura de ensaio e determina-se a concentração da substância em estudo na fase aquosa

▼M4

límpida, recorrendo a um método analítico adequado. Procede-se do mesmo modo com os outros dois balões, após o equilíbrio inicial a 30 °C, respetivamente durante dois e três dias. Se as concentrações medidas pelo menos nos dois últimos recipientes não diferirem entre si mais de 15 %, o ensaio é satisfatório. Se os resultados obtidos para os recipientes 1, 2 e 3 mostrarem uma tendência crescente, repete-se todo o ensaio, utilizando tempos de equilibragem maiores.

24. O ensaio também pode efetuar-se sem o período prévio a 30 °C. Para verificar se já se estabeleceu o equilíbrio de saturação, vai-se colhendo amostras até que o tempo de agitação deixe de influenciar as concentrações medidas.

25. Mede-se o pH de cada amostra, de preferência com bandas indicadoras próprias.

Determinações analíticas

26. É preferível recorrer a um método específico para a substância em causa, dado que a presença de pequenas quantidades de impurezas solúveis pode causar grandes erros na solubilidade medida. Exemplos: cromatografia em fase líquida ou em fase gasosa, titulação, fotometria e voltametria.

DADOS E RELATÓRIOS

Dados

Método de eluição em coluna

27. Calcula-se, para cada série, o valor médio e o desvio-padrão de pelo menos cinco amostras consecutivas recolhidas no patamar de saturação. Os valores médios obtidos em dois ensaios com caudais diferentes não devem diferir mais de 30 %.

Método do balão

28. Calcula-se o valor médio dos resultados obtidos para cada um dos três balões, que não devem diferir entre si mais de 15 %.

Relatório dos ensaios

Método de eluição em coluna

29. Elementos a constar do relatório dos ensaios:

— resultados do ensaio preliminar,

— identidade química e impurezas (eventual etapa preliminar de purificação),

— concentração, caudal e pH correspondentes a cada amostra,

— média e desvio-padrão de, pelo menos, cinco amostras do patamar de saturação de cada série,

— média de, pelo menos, duas séries consecutivas,

— temperatura da água durante o processo de saturação,

— método de análise,

— material de enchimento,

— impregnação do material de enchimento,

— solvente utilizado,

— indícios de eventual instabilidade química da substância durante o ensaio,

— todas as informações importantes para a interpretação dos resultados, especialmente no que respeita a impurezas e ao estado físico da substância em estudo.

▼**M4**

Método do balão

30. Elementos a constar do relatório dos ensaios:

— resultados do ensaio preliminar,

— identidade química e impurezas (eventual etapa preliminar de purificação),

— cada uma das determinações analíticas — e o respetivo valor médio, no caso de se ter determinado mais de um valor para cada balão,

— pH de cada amostra,

— média dos valores correspondentes aos balões concordantes,

— temperatura do ensaio,

— método analítico,

— indícios de eventual instabilidade química da substância durante o ensaio,

— todas as informações importantes para a interpretação dos resultados, especialmente no que respeita a impurezas e ao estado físico da substância em estudo.

REFERÊNCIAS

(1) Diretiva 92/69/CEE da Comissão, de 31 de julho de 1992, que adapta ao progresso técnico pela décima sétima vez a Diretiva 67/548/CEE do Conselho relativa à aproximação das disposições legislativas, regulamentares e administrativas respeitantes à classificação, embalagem e rotulagem das substâncias perigosas (JO L 383 de 29.12.1992, p. 113).

(2) NF T 20-045 (AFNOR) (setembro de 1985). Chemical products for industrial use — Determination of water solubility of solids and liquids with low solubility — Column elution method.

(3) NF T 20-046 (AFNOR) (setembro de 1985). Chemical products for industrial use — Determination of water solubility of solids and liquids with high solubility — Flask method.

▼B

A.8 COEFICIENTE DE PARTIÇÃO

1. MÉTODO

O método do «frasco agitado» descrito baseia-se na norma de ensaio da OCDE (1).

1.1. INTRODUÇÃO

É útil possuir informações preliminares sobre a fórmula estrutural, a constante de dissociação, a solubilidade em água, hidrólise, solubilidade em n-octanol e tensão superficial, da substância sujeita a este teste.

As medições deverão ser efectuadas em substâncias ionizáveis apenas na sua forma não ionizada (ácido livre ou base livre) produzida pela utilização de um tampão apropriado cujo pH possua um valor de pelo menos uma unidade de pH abaixo (ácido livre) ou acima (base livre) do valor pK.

Este método de ensaio engloba dois procedimentos separados — o método do frasco agitado e a cromatografia líquida de elevado rendimento (mais conhecida por «HPLC» ou High Performance Liquid Chromatography). O primeiro método aplica-se nos casos em que o valor log P_{oa} (ver as definições mais adiante) se encontra no intervalo entre — 2 e 4 e o outro método aplica-se nos casos em que aquele valor está compreendido entre 0 e 6. Antes de se executar qualquer dos procedimentos experimentais dever-se-á obter primeiro uma estimativa preliminar do coeficiente de partição.

O método do frasco agitado aplica-se apenas a substâncias essencialmente puras solúveis em água e em n-octanol. Não é aplicável aos materiais tensioactivos (para os quais deverá ser obtido o valor calculado ou uma estimativa com base nas solubilidades individuais em n-octanol e em água).

O método de HPLC não se aplica a bases e ácidos fortes, a complexos de metais, a materiais tensioactivos ou a substâncias que reajam com o eluente. Para estes materiais deverá ser obtido um valor calculado ou uma estimativa, tomando como base as solubilidades individuais em n-octanol e em água.

O método de HPLC é menos sensível à presença de impurezas do que o método do frasco agitado. Contudo, em alguns casos as impurezas podem tornar difícil a interpretação de resultados devido ao facto de se tornar incerta a determinação dos picos. Para misturas que originem uma banda não resolvida deverão ser especificados os limites inferior e superior de log P.

1.2. DEFINIÇÃO E UNIDADES

Define-se o coeficiente de partição (P) como sendo a razão entre as concentrações de equilíbrio (c_i) de uma substância dissolvida num sistema de duas fases, constituído por dois solventes claramente imiscíveis. No caso do n-octanol e da água temos:

$$P_{ow} = \frac{c_{n-octanol}}{c_{water}}$$

Em consequência, o coeficiente de partição (P) é o quociente entre duas concentrações e é dado vulgarmente na forma do seu logaritmo de base 10 (log P).

▼B

1.3. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

Método do frasco agitado

Não é necessário utilizar substâncias de referência quando se está a investigar uma nova substância. Essas substâncias servem essencialmente para verificar, de vez em quando, a calibração do método e para proporcionar a comparação com resultados obtidos com outros métodos.

Método de HPLC

No sentido de se estabelecer uma correlação entre os dados de HPLC medidos para um determinado composto com o seu valor P, torna-se necessário estabelecer um gráfico de calibração de log P em função dos dados cromatográficos utilizando pelo menos 6 pontos de referência. É deixado ao arbítrio do utilizador seleccionar as substâncias de referência apropriadas. Sempre que possível, pelo menos uma substância de referência deverá possuir um valor P_{oa} superior, e outra um valor P_{oa} inferior ao da substância a testar. Para valores de log P inferiores a 4, a calibração pode basear-se nos dados obtidos pelo método do frasco agitado. Para valores de log P superiores a 4, a calibração pode basear-se em valores calibrados e publicados em diversa literatura se esses valores estiverem em conformidade com os valores calculados. Para se conseguir melhor precisão é preferível escolher substâncias de referência cuja estrutura química esteja relacionada com a da substância a testar.

Existem disponíveis listagens extensivas de valores de log P_{oa} para muitos grupos de compostos químicos (2)(3). No caso dos dados sobre os coeficientes de partição dos compostos estruturalmente afins não se encontrarem disponíveis, pode-se utilizar então uma calibração mais geral estabelecida com outros compostos de referência.

No apêndice 2 apresenta-se uma listagem de substâncias de referência recomendadas e seus valores P_{oa}.

1.4. PRINCÍPIO DO MÉTODO

1.4.1. **Método do frasco agitado**

No sentido de se determinar um coeficiente de partição, torna-se necessário conseguir o equilíbrio entre todos os componentes do sistema que actuam entre si e devem-se determinar as concentrações das substâncias dissolvidas nas duas fases. Um estudo publicado na literatura relativa a este assunto indica que é possível utilizar diversas técnicas diferentes para resolução deste problema, isto é, a mistura perfeita das duas fases seguindo-se a sua separação, no sentido de se determinar a concentração de equilíbrio para a substância que se pretende examinar.

1.4.2. **Método de HPLC**

Efectua-se o HPLC em colunas analíticas carregadas com uma fase sólida comercialmente disponível contendo hidrocarbonetos de cadeia longa (por exemplo C_8, C_{18}) quimicamente ligados à sílica. Os compostos químicos injectados nessa coluna movem-se através dela a velocidades diferentes devido aos diferentes graus de partição entre a fase móvel e a fase estacionária do hidrocarboneto. As misturas de compostos químicas são eluídas por ordem da sua hidrofobicidade, sendo eluídos primeiro os compostos químicos solúveis em água e depois os compostos químicos solúveis em óleo, proporcionalmente ao seu coeficiente de partição entre hidrocarboneto e água. Isto permite estabelecer uma relação entre o tempo de retenção numa tal coluna (fase reversa) e o coeficiente de partição entre n-octanol/água. Deduz-se o coeficiente de partição a partir do factor de capacidade k, dado pela expressão:

▼B

$$k = \frac{t_r - t_o}{t_o}$$

na qual t_r = tempo de retenção da substância a testar e t_0 = tempo médio que uma molécula de solvente necessita para passar através da coluna (tempo limite).

Não são necessários métodos analíticos quantitativos e apenas é necessária a determinação dos tempos de eluição.

1.5. CRITÉRIOS DE QUALIDADE

1.5.1. **Repetitividade**

Método do frasco agitado

No sentido de se garantir a exactidão do coeficiente de partição é necessário efectuar determinações em duplicado sob três condições de ensaio diferentes, podendo consequentemente alterar a quantidade de substância especificada e também a proporção entre os volumes de solvente. Os valores determinados do coeficiente de partição, expressos pelos seus logaritmos, deverão estar compreendidos num intervalo limitado por ± 0,3 unidades logarítmicas.

Método de HPLC

No sentido de se aumentar a confiança da medição deverão ser efectuadas determinações em duplicado. Os valores de log P derivados das medições individuais deverão estar dentro de um intervalo limitado por ± 0,1 unidades logarítmicas.

1.5.2. **Sensibilidade**

Método do frasco agitado

Determina-se o intervalo de medição do método pelo limite de detecção do procedimento analítico. Isto deverá permitir a determinação de valores log P_{oa} no intervalo compreendido entre - 2 e 4 (ocasionalmente, quando houver condições adequadas, este intervalo pode ser dilatado até valores de log P_{oa} próximos de 5), quando a concentração do soluto em qualquer fase não for superior a 0,01 mol por litro.

Método de HPLC

O método de HPLC permite estimar os coeficientes de partição em termos de log P_{oa} no intervalo 0 a 6.

Normalmente o coeficiente de partição de um composto pode ser estimado a menos de ± 1 unidade logarítmica relativamente ao valor obtido pelo método do frasco agitado. Existem correlações típicas que é possível encontrar na literatura (4)(5)(6)(7)(8). Normalmente, pode-se conseguir uma precisão superior quando as curvas de correlação se baseiam em compostos de referência estruturalmente afins (9).

▼B

1.5.3. **Especificidade**

Método do frasco agitado

A Lei de Partição de Nernst aplica-se apenas quando os parâmetros temperatura, pressão e pH são constantes para soluções diluídas. Aplica-se estritamente a uma substância pura dispersa entre dois solventes puros. Se houver diversos solutos diferentes numa ou em ambas as fases simultaneamente, isto pode afectar os resultados.

A dissociação ou a associação das moléculas dissolvidas provoca desvios em relação à Lei de Partição de Nernst. Esses desvios são indicados pelo facto de o coeficiente de partição se tornar dependente da concentração da solução.

Devido à existência de múltiplos estados de equilíbrio, este método não deve ser aplicado a compostos ionizáveis sem se aplicar uma correcção. Deve-se tomar em consideração a utilização de soluções-tampão em vez de água para esses compostos; o valor do pH da solução-tampão deverá ser pelo menos uma unidade de pH afastada do valor pKa da substância e deve-se ter sempre presente a relevância desse valor de pH para o ambiente.

1.6. DESCRIÇÃO DO MÉTODO

1.6.1. **Estimativa preliminar do coeficiente de partição**

Efectua-se uma estimativa do coeficiente de partição utilizando preferencialmente um método de cálculo (ver apêndice 1) ou, se for apropriado, recorrendo à razão entre solubilidades da substância a testar nos solventes puros (10).

1.6.2. **Método do frasco agitado**

1.6.2.1. *Preparação*

n-octanol: a determinação do coeficiente de partição deverá ser efectuada com um reagente de qualidade analítica de elevada pureza.

Água: deve-se utilizar água destilada ou bidestilada num aparelho de vidro ou de quartzo. Para os compostos ionizáveis dever-se-á utilizar soluções-tampão em vez de água, se tal se justificar.

Nota:

Não deve ser utilizada água obtida directamente a partir de um permutador iónico.

1.6.2.1.1. Pré-saturação dos solventes

Antes de se determinar um coeficiente de partição as fases do sistema solvente são mutuamente saturadas por agitação à temperatura da experiência. Para se conseguir isto, é prática corrente agitar dois frascos grandes contendo água ou n-octanol de qualidade analítica, contendo cada um deles uma quantidade suficiente do outro solvente, durante um período de 24 horas, num agitador mecânico, e deixando-os depois em repouso durante um período de tempo suficiente para permitir a separação de fases e para se conseguir um estado de saturação.

▼B

1.6.2.1.2. Preparação para o ensaio

O volume total do sistema bifásico deverá encher quase completamente o recipiente de ensaio. Isto auxiliará a evitar as perdas de material por volatilização. A razão volumétrica e as quantidades de substância a utilizar são fixadas pelos factores seguintes:

— avaliação preliminar do coeficiente de partição (ver *supra*),

— a quantidade mínima da substância a testar necessária para o procedimento analítico, e

— a limitação de uma concentração máxima, em qualquer das fases, no valor de 0,01 mol por litro.

Efectuam-se três testes. No primeiro utiliza-se a razão volumétrica calculada entre n-octanol e a água; no segundo divide-se essa razão por dois e no terceiro multiplica-se essa razão por dois (por exemplo, 1:1, 1:2, 2:1).

1.6.2.1.3. Substância a testar

Prepara-se uma solução em n-octanol pré-saturado com água. A concentração desta solução deverá ser determinada com exactidão antes de se utilizar na determinação do coeficiente de partição. Esta solução deverá ser guardada em condições que assegurem a sua estabilidade.

1.6.2.2. *Condições de ensaio*

A temperatura de ensaio deverá ser mantida constante (± 1 ^{o}C) e estar compreendida no intervalo entre 20 e 25 ^{o}C.

1.6.2.3. *Procedimento de medição*

1.6.2.3.1. Estabelecimento do equilíbrio de partição

Para cada uma das condições de ensaio dever-se-á preparar recipientes de ensaio em duplicado, contendo as quantidades necessárias, medidas com exactidão, dos dois solventes em conjunto com a quantidade necessária da solução referida.

Deve-se medir o volume das fases de n-octanol. Os recipientes de ensaio deverão ser colocados num agitador adequado ou em alternativa deverão ser agitados manualmente. Quando se usa um tubo de centrifugação, o método recomendado consiste em rodar o tubo rapidamente 180^{o} em torno do seu eixo transversal, de modo que qualquer bolha de ar que esteja presa se movimente através das duas fases. A experiência demonstrou que 50 rotações deste tipo são normalmente suficientes para se estabelecer o equilíbrio de partição. Para melhor garantia, recomenda-se a execução de 100 rotações em 5 minutos.

1.6.2.3.2. Separação de fases

Sempre que necessário, no sentido de se efectuar a separação de fases, dever-se-á efectuar a centrifugação da mistura. Isto deverá ser feito numa centrifugadora de laboratório mantida à temperatura ambiente ou, no caso de se utilizar uma centrifugadora de temperatura não controlada, os tubos de centrifugação deverão ser mantidos, por razões de equilíbrio, à temperatura de ensaio durante pelo menos 1 hora antes da análise.

▼B

1.6.2.4. *Análise*

Para a determinação do coeficiente de partição é necessário determinar as concentrações da substância a testar em ambas as fases. Isto pode ser feito extraindo uma quantidade alíquota de cada uma das duas fases a partir de cada um dos tubos, de cada uma das séries de ensaio, procedendo depois à sua análise de acordo com o procedimento escolhido. Deve-se calcular a quantidade total de substância presente em ambas as fases e efectuar-se-á a comparação com a quantidade de substância originalmente introduzida.

Deverá ser extraída uma amostra da fase aquosa recorrendo a um procedimento que minimize o risco de introduzir vestígios de n-octanol: pode-se utilizar uma seringa de vidro com uma agulha removível para extrair uma amostra da fase aquosa. A seringa deverá estar, de início, parcialmente cheia com ar. O ar deverá ser expelido suavemente enquanto se introduz a agulha através da camada de n-octanol. Retira-se com a seringa um volume adequado de fase aquosa. Remove-se a seringa rapidamente da solução e separa-se a agulha. O conteúdo da seringa pode ser utilizado depois como amostra aquosa. A concentração das duas fases separadas deverá ser determinada preferencialmente recorrendo a um método específico da substância. Como exemplos de métodos analíticos considerados apropriados faz-se referência aos seguintes:

— métodos fotométricos,

— cromatografia gasosa,

— cromatografia líquida de elevado rendimento (HPLC).

1.6.3. **Método de HPLC**

1.6.3.1. *Preparação*

Aparelho

É necessário um cromatógrafo líquido equipado com uma bomba de pulsação livre e um dispositivo de detecção adequado. Recomenda-se a utilização de uma válvula de injecção com ciclos de injecção. A presença de grupos polares na fase estacionária pode prejudicar gravemente os resultados da coluna de HPLC. Em consequência, as fases estacionárias deverão possuir uma percentagem mínima de grupos polares (11). Podem-se utilizar colunas pré-carregadas ou cargas de fase reversa de micropartículas disponíveis comercialmente. Pode-se interpor uma coluna de protecção entre o sistema de injecção e a coluna analítica.

Fase móvel

Utiliza-se metanol e água de qualidade apropriada para HPLC, para a preparação do solvente de eluição, o qual é desgaseificado antes da utilização. Deve-se utilizar uma eluição isocrática. Dever-se-á utilizar proporções metanol/água com um teor mínimo de água de 25 %. Normalmente, é satisfatória a proporção de 3:1 (v/v) para a mistura de metanol/água para se efectuar a eluição de compostos de log P 6 ao fim de uma hora para um débito de 1 mililitro por minuto. Para os compostos com um valor log P elevado pode ser necessário reduzir o tempo de eluição (e também para os compostos de referência) diminuindo a polaridade da fase móvel ou o comprimento da coluna.

As substâncias com muito fraca solubilidade em n-octanol tendem a originar valores de log P_{oa} anormalmente baixos quando se utiliza o método de HPLC; os picos desses compostos acompanham frequentemente a frente do solvente. Isto deve-se provavelmente ao facto de o processo de partição ser muito lento não se atingindo o equilíbrio no tempo normalmente necessário para uma separação por HPLC. Consequentemente, a diminuição do débito e/ou a diminuição da proporção metanol/água pode ser eficaz para se atingir um valor de confiança.

▼B

Os compostos de ensaio e de referência deverão ser solúveis na fase móvel em concentrações suficientes para permitirem as suas detecções. Apenas em casos excepcionais será aceitável adicionar aditivos à mistura de metanol/água, uma vez que esses aditivos irão modificar as propriedades da coluna. Para as cromatografias com aditivos é obrigatório utilizar uma coluna separada do mesmo tipo. No caso de a mistura metanol/água não ser apropriada é possível utilizar outras misturas de solvente orgânico/água, por exemplo, etanol/água ou acetonitrilo/água.

O pH do eluente constitui um parâmetro crítico para os compostos ionizáveis. Aquele valor deverá estar compreendido no intervalo de valores de pH de funcionamento da coluna, sendo esse intervalo normalmente compreendido entre 2 e 8. Recomenda-se a utilização de uma mistura tampão. É necessário tomar precauções para evitar a precipitação de sal e a deterioração da coluna cuja ocorrência é possível com algumas misturas de fase orgânica/tampão. As medições por HPLC com fases estacionárias à base de sílica, para valores de pH superiores a 8, não são aconselháveis uma vez que a utilização de uma fase móvel alcalina pode provocar a deterioração rápida do funcionamento da coluna.

Solutos

Os compostos de referência deverão possuir a maior pureza possível. Os compostos destinados a serem utilizados para efeitos de ensaio ou calibração são dissolvidos na fase móvel, se possível.

Condições de ensaio

Durante as medições a temperatura não deverá variar ± 2 K.

1.6.3.2. **Medição**

Cálculo do tempo limite t_o

O tempo limite t_o pode ser determinado utilizando em alternativa uma série homóloga (por exemplo, n-alquil-metil-cetonas) ou compostos orgânicos não retidos (por exemplo, tioureia ou formamida). Para se calcular o tempo limite t_o utilizando uma série homóloga, injecta-se um conjunto de pelo menos 7 componentes de uma série homóloga e procede-se à determinação dos respectivos tempos de retenção. Elabora-se um gráfico dos tempos de retenção $t_{r(n_c + 1)}$ em função de $t_{r(n_c)}$ e procede-se à determinação da ordenada a na origem e do declive b, através da equação de regressão:

$$t_{r(n_c + 1)} = a + b\ t_{r(n_c)}$$

(n_c = número de átomos de carbono). O tempo limite t_o é dado pela equação:

$$t_o = a/(1 - b)$$

▼B

Gráfico de calibração

O passo seguinte consiste em construir a curva de correlação de log k em função de log P para os compostos de referência apropriados. Na prática, efectua-se a injecção simultânea, de um conjunto compreendido entre 5 e 10 compostos de referência padrão cujo valor log P seja próximo do valor esperado e procede-se à determinação dos tempos de retenção, utilizando preferencialmente um integrador de registo ligado ao sistema de detecção. Procede-se ao cálculo dos logaritmos correspondentes dos factores de capacidade, log k, e traça-se uma curva em função do valor log P determinado pelo método do frasco agitado. Efectua-se a calibração a intervalos regulares, pelo menos uma vez diariamente, de modo a poder fazer a compensação das possíveis variações na evolução da coluna.

Determinação do factor de capacidade da substância de ensaio

Injecta-se a substância de ensaio numa quantidade da fase móvel tão pequena quanto possível. Determina-se o tempo de retenção (em duplicado), permitindo o cálculo do factor k de capacidade. A partir do gráfico de correlação dos compostos de referência, pode-se fazer uma interpolação para determinação do coeficiente de partição da substância de ensaio. Para coeficientes de partição muito baixos ou muito elevados é necessária a extrapolação. Nesses casos particulares é necessário tomar precauções relativamente aos limites de confiança da curva de regressão.

2. **RESULTADOS**

Método do frasco agitado

Pode-se testar a fiabilidade dos valores de P determinados efectuando a comparação das médias das determinações em duplicado com a média geral.

3. **RELATÓRIO**

O relatório do ensaio deverá conter, se possível, a informação seguinte:

— especificação exacta da substância (identificação e impurezas),

— no caso de os métodos não serem aplicáveis (por exemplo, material tensioactivo), apresentar-se-á um valor calculado ou uma estimativa tomando como base as solubilidades individuais em n-octanol e em água,

— todas as informações e notas relevantes para a interpretação dos resultados, especialmente no que diz respeito a impurezas e ao estado físico da substância.

Para o caso do método do frasco agitado:

— o resultado da estimativa preliminar, se existir,

— temperatura da determinação,

— dados relativos aos procedimentos analíticos utilizados na determinação das concentrações,

— tempo e velocidade de centrifugação, se for caso disso,

▼B

— concentrações medidas de ambas as fases para cada determinação (significa isto que deverão ser descritas 12 concentrações na totalidade),

— o peso da substância de ensaio, o volume de cada fase utilizada em cada recipiente de ensaio e a quantidade total calculada de substância de ensaio presente em cada fase após se atingir o equilíbrio,

— para cada conjunto de condições de ensaio deverão ser indicados os valores calculados do coeficiente de partição (P) e o valor médio, devendo-se indicar igualmente a média para todas as determinações. No caso de haver indícios de dependência da concentração relativamente ao coeficiente de partição, esse facto deverá constar do relatório,

— deve-se referir o desvio-padrão dos valores P individuais relativamente à sua média,

— o valor médio de P correspondente a todas as determinações deve ser expresso também na forma logarítmica (base 10),

— o valor teórico P_{oa} calculado no caso de se ter feito a determinação desse valor ou quando o valor medido for $> 10^4$,

— os valores de pH da água utilizada e da fase aquosa durante a experiência,

— no caso de se ter recorrido à utilização de tampões, o relatório deverá conter justificação da utilização desses tampões em vez de água, a sua composição, a sua concentração e os valores de pH e também os valores de pH da fase aquosa antes e após a experiência.

Para o caso do método de HPLC:

— o resultado da estimativa preliminar, se existir,

— substâncias de ensaio e de referência e sua pureza,

— intervalo de temperaturas das determinações,

— os valores de pH para os quais foram feitas as determinações,

— pormenores sobre a coluna analítica e sobre a coluna de protecção, fase móvel e meios de detecção,

— dados de retenção e valores de log P encontrados na literatura para os compostos de referência utilizados na calibração,

— pormenores sobre a linha de regressão ajustada (log k em função de log P),

— dados de retenção média e valor de log P interpolado para o composto de ensaio,

— descrição do equipamento e condições de funcionamento,

— perfil de eluição,

— quantidades das substâncias de ensaio e de referência introduzidas na coluna,

— tempo limite e método para a sua medição.

▼B

4. **REFERÊNCIAS**

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 107, Decision of the Council C(81) 30 final.

(2) C. Hansch and A.J. Leo, Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, New York, 1979.

(3) Log P and Parameter Database, A tool for the quantitative prediction of bioactivity (C. Hansch, chairman, A.J. Leo, dir.) — Available from Pomona College Medical Chemistry Project 1982, Pomona College, Claremont, California 91711.

(4) L. Renberg, G. Sundström and K. Sundh-Nygãrd, Chemosphere, 1980, vol. 80, p. 683.

(5) H. Ellgehausen, C. D'Hondt and R. Fuerer, Pestic. Sci., 1981, vol. 12, p. 219 (1981).

(6) B. McDuffie, Chemosphere, 1981, vol. 10, p. 73.

(7) W.E. Hammers et al., J. Chromatogr., 1982, vol. 247, p. 1.

(8) J.E. Haky and A.M. Young, J. Liq. Chromat., 1984, vol. 7, p. 675.

(9) S. Fujisawa and E. Masuhara, J. Biomed. Mat. Res., 1981, vol. 15, p. 787.

(10) O. Jubermann, Verteilen und Extrahieren, in Methoden der Organischen Chemie (Houben Weyl), Allgemeine Laboratoriumpraxis (edited by E.Muller), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1958, Band 1/1, p. 223-339.

(11) R.F. Rekker and H.M. de Kort, Euro. J. Med. Chem., 1979, vol. 14, p. 479.

(12) A. Leo, C. Hansch and D. Elkins, Partition coefficients and their uses, Chem. Rev., 1971, vol. 71, p. 525.

(13) R.F. Rekker, The Hydrophobic Fragmentai Constant, Elsevier, Amsterdam, 1977.

(14) NF T 20-043 AFNOR (1985). Chemical products for industrial use — Determination of partition coefficient — Flask shaking method.

(15) C.V. Eadsforth and P.Moser, Chemosphere, 1983, vol. 12, p. 1459.

(16) A. Leo, C. Hansch and D. Elkins, Chem. Rev., 1971, vol. 71, p. 525.

(17) C. Hansch, A. Leo, S.H. Unger, K.H. Kim, D. Nikaitani and E.J. Lien, J. Med. Chem., 1973, vol. 16, p. 1207.

(18) W.B. Neely, D.R. Branson and G.E. Blau, Environ. Sci Technol., 1974, vol. 8, p. 1113.

(19) D.S. Brown and E.W. Flagg, J. Environ. Qual., 1981, vol. 10, p. 382.

(20) J.K. Seydel and K.J. Schaper, Chemische Struktur und biologische Aktivität von Wirkstoffen, Verlag Chemie, Weinheim, New York, 1979.

▼B

(21) R. Franke, Theoretical Drug Design Methods, Elsevier, Amsterdam, 1984.

(22) Y.C. Martin, Quantitative Drug Design, Marcel Dekker, New York, Basel, 1978.

(23) N.S. Nirrlees, S.J. Noulton, C.T. Murphy, P.J. Taylor, J. Med. Chem., 1976, vol. 19, p. 615.

▼B

Apêndice 1

Métodos de cálculo/estimação

INTRODUÇÃO

Na publicação «Handbook of Chemical Property Estimation Methods» (a) encontra-se uma introdução geral aos métodos de cálculo, dados e exemplos.

É possível utilizar os valores calculados de P_{oa}:

— para se decidir qual dos métodos experimentais é apropriado (gama de utilização para o frasco agitado: log P_{oa}: - 2 a 4, gama de HPLC: log P_{oa}: 0 a 6),

— para selecção das condições de ensaio apropriadas (por exemplo, substâncias de referência para os procedimentos de HPLC, relação volumétrica n-octanol/água para o método do frasco agitado),

— como verificação interna laboratorial sobre possíveis erros experimentais,

— para se obter um valor estimado de P_{oa} no caso em que os métodos experimentais não podem ser aplicados por razões técnicas.

MÉTODO DE ESTIMAÇÃO

Estimativa preliminar do coeficiente de partição

Pode-se estimar o valor do coeficiente de partição conhecendo as solubilidades da substância de ensaio em solventes puros, utilizando a equação:

$$P_{estimado} = \frac{\text{saturação } c_{n-octanol}}{\text{saturação } c_{água}}$$

MÉTODOS DE CÁLCULO

Princípio dos métodos de cálculo

Todos os métodos de cálculo se baseiam na fragmentação formal da molécula em substruturas adequadas para as quais sejam conhecidos valores dos fragmentos de log P_{oa}. Calcula-se depois o valor log P_{oa} da molécula inteira como sendo a soma dos correspondentes valores dos seus fragmentos mais a soma dos termos de correcção, para as interacções intramoleculares.

Existem disponíveis listas de constantes dos fragmentos e dos termos de correlação (b)(c)(d)(e). Algumas são actualizadas regularmente (b).

Critérios de qualidade

De um modo geral, a fiabilidade do método de cálculo diminui com a complexidade crescente do composto submetido a estudo. No caso de moléculas simples com baixo peso molecular e com um ou dois grupos funcionais admite-se um desvio compreendido entre 0,1 e 0,3 unidades de log P_{oa} entre os resultados obtidos com diferentes métodos de fragmentação e o valor medido. No caso das moléculas mais complexas a margem de erro pode ser superior. Isto dependerá da fiabilidade e da disponibilidade de constantes dos fragmentos e também da capacidade para identificar interacções intramoleculares (por exemplo, ligações de hidrogénio) e para utilizar correctamente os termos de correcção (este problema pode ser minimizado utilizando a aplicação informática CLOGP-3) (b). No caso dos compostos ionizantes é importante tomar em consideração correctamente a carga e o grau de ionisação.

▼B

Procedimentos de cálculo

Método π de Hansch

A constante do substituinte hidrofóbico original, π, introduzida por Fujita et al. (f), define-se do modo seguinte:

$$\pi_x = \log P_{oa}\,(PhX) - \log P_{oa}\,(PhH)$$

em que P_{oa} (PhX) representa o coeficiente de partição de um derivado aromático e P_{oa} (PhH) representa o coeficiente de partição do composto original

(por exemplo: $\pi_{Cl} = \log P_{oa}\,(C_6H_5Cl) - \log P_{oa}\,(C_6H_6) = 2{,}84 - 2{,}13 = 0{,}71$).

De acordo com esta definição, o método π é aplicável essencialmente nos casos de substituição aromática. Os valores π para um grande número de substituintes encontram-se em tabelas (b)(c)(d) e são utilizados para o cálculo dos valores log P_{oa} de substruturas ou moléculas aromáticas.

Método de Rekker

De acordo com Rekker (g) o valor de log P_{oa} calcula-se do modo seguinte:

$$\log P_{oa} = \sum_i a_i\, f_i + \sum_j (\text{termos de interacção})$$

em que f_i representa as diferentes constantes dos fragmentos moleculares e a_i representa a frequência da sua ocorrência na molécula sujeita a investigação. Os termos de correcção podem ser expressos na forma de um integral múltiplo de uma única constante C_m (designada por «constante mágica»). As constantes dos fragmentos f_i e C_m foram determinadas a partir de uma listagem de 1 054 valores experimentais de P_{oa} (825 compostos) utilizando análise de regressão múltipla (c)(h). A determinação dos termos de interacção efectua-se de acordo com regras consagradas descritas na literatura (e)(h)(i).

Método de Hansch-Leo

De acordo com Hansch e Leo (c) calcula-se o valor de log P_{oa} de acordo com a equação:

$$\log P_{oa} = \sum_i a_i\, f_i + \sum_j b_j\, F_j$$

em que f_i representa as diferentes constantes dos fragmentos moleculares, F_j representa os termos de correcção e a_i e b_j representam as correspondentes frequências de ocorrência. Por aproximações sucessivas determinou-se, a partir dos valores experimentais de P_{oa}, uma listagem de valores de fragmentos atómicos e de grupos e uma listagem dos termos de correcção F_j (designados «factores»). Os termos de correcção foram ordenados segundo diversas classes diferentes (a)(c). É relativamente complicado e moroso levar em consideração todas as regras e termos de correcção. Existem disponíveis diversas aplicações informáticas (b).

Método combinado

O cálculo dos valores log P_{oa} de moléculas complexas pode ser consideravelmente aperfeiçoado, se a molécula for cindida em substruturas para as quais se encontrem disponíveis valores fiáveis de log P_{oa}, tanto a partir de tabelas (b)(c) como a partir das medições do próprio investigador. Esses fragmentos (por exemplo, heterociclos, antraquinona, azobenzeno) podem ser combinados depois com os valores y segundo Hansch ou com as constantes dos fragmentos segundo Rekker ou Leo.

Observações

i) Os métodos de cálculo apenas podem ser aplicados a compostos parcial ou totalmente ionizados no caso de ser possível tomar em consideração os necessários factores de correcção;

▼B

ii) No caso de se admitir a existência de ligações intramoleculares entre átomos de hidrogénio é necessário adicionar (a) os correspondentes termos de correcção (aproximadamente + 0,6 a + 1,0 unidades log P_{oa}). As indicações para a presença dessas ligações podem ser obtidas a partir de modelos espaciais ou a partir de dados espectroscópicos da molécula;

iii) No caso de serem possíveis diversas formas tautoméricas, deve-se utilizar a forma mais provável como base de cálculo;

iv) As revisões das listagens de constantes de fragmentos deverão ser acompanhadas cuidadosamente.

Relatório

No caso de se utilizar métodos de cálculo/estimação o relatório do ensaio deverá, se possível, conter a informação seguinte:

— descrição da substância (mistura, impurezas, etc.),

— indicação de quaisquer possíveis ligações intramoleculares entre átomos de hidrogénio, dissociação, carga e quaisquer outros efeitos extraordinários (por exemplo, tautomerismo),

— descrição do método de cálculo,

— identificação ou fonte da base de dados,

— peculiaridades na escolha dos fragmentos,

— documentação compreensiva relativa aos cálculos.

BIBLIOGRAFIA

(a) W.J. Lyman, W.F. Reehl and D.H. Rosenblatt (ed.), Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill, New York, 1983.

(b) Pomona College, Medicinal Chemistry Project, Claremont, California 91711, USA, Log P Database and Med. Chem. Software (Program CLOGP-3).

(c) C. Hansch, A.J. Leo, Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, New York, 1979.

(d) A. Leo, C. Hansch, D. Elkins, Chem. Rev., 1971, vol. 71, p. 525.

(e) R.F. Rekker, H.M. de Kort, Eur. J. Med. Chem. — Chim. Ther. 1979, vol. 14, p. 479.

(f) T. Fujita, J. Iwasa and C. Hansch, J. Amer. Chem. Soc., 1964, vol. 86, p. 5175.

(g) R.F. Rekker, The Hydrophobic Fragmentai Constant, Pharmacochemistry Library, Elsevier, New York, 1977, vol. 1.

(h) C.V. Eadsforth, P. Moser, Chemosphere, 1983, vol. 12, p. 1459.

(i) R.A. Scherrer, ACS — American Chemical Society, Washington D.C., 1984, Symposium Series 255, p. 225.

▼B

Apêndice 2

Substâncias de referência recomendadas para o método de HPLC

	Substância de referência 2-butanona	log P_{oa}	pKa
1	2-butanona	0,3	
2	4-acetilpiridina	0,5	
3	anilina	0,9	
4	acetanilida	1,0	
5	álcool benzílico	1,1	
6	p-metoxifenol	1,3	pKa = 10,26
7	ácido fenoxi-acético	1,4	pKa = 3,12
8	fenol	1,5	pKa = 9,92
9	2,4-dinitrofenol	1,5	pKa = 3,96
10	benzonitrilo	1,6	
11	fenilacetonitrilo	1,6	
12	álcool 4-metilbenzílico	1,6	
13	acetofenona	1,7	
14	2-nitrofenol	1,8	pKa = 7,17
15	ácido 3-nitrobenzóico	1,8	pKa = 3,47
16	4-cloranilina	1,8	pKa = 4,15
17	nitrobenzeno	1,9	
18	álcool cinâmico	1,9	
19	ácido benzóico	1,9	pKa = 4,19
20	p-cresol	1,9	pKa = 10,17
21	ácido cinâmico	2,1	pKa = 3,89 cis 4,44 trans
22	anisol	2,1	
23	benzoato de metilo	2,1	
24	benzeno	2,1	
25	ácido 3-metilbenzóico	2,4	pKa = 4,27
26	4-clorofenol	2,4	pKa = 9,1
27	tricloroetileno	2,4	
28	atrazina	2,6	
29	benzoato de etilo	2,6	
30	2,6-diclorobenzonitrilo	2,6	
31	ácido 3-clorobenzóico	2,7	pKa = 3,82
32	tolueno	2,7	
33	1-naftol	2,7	pKa = 9,34
34	2,3-dicloroanilina	2,8	
35	clorobenzeno	2,8	
36	éter alil-fenílico	2,9	
37	bromobenzeno	3,0	

▼B

	Substância de referência 2-butanona	log P_{oa}	pKa
38	etilbenzeno	3,2	
39	benzofenona	3,2	
40	4-fenilfenol	3,2	pKa = 9,54
41	timol	3,3	
42	1,4-diclorobenzeno	3,4	
43	difenilamina	3,4	pKa = 0,79
44	naftaleno	3,6	
45	benzoato de fenilo	3,6	
46	isopropilbenzeno	3,7	
47	2,4,6-triclorofenol	3,7	pKa = 6
48	bifenilo	4,0	
49	benzoato de benzilo	4,0	
50	2,4-dinitro-6-sec-butil-fenol	4,1	
51	1,2,4-tricloro-benzeno	4,2	
52	ácido dodecanóico	4,2	
53	éter difenílico	4,2	
54	n-butil-benzeno	4,5	
55	fenantreno	4,5	
56	fluoranteno	4,7	
57	dibenzilo	4,8	
58	2,6-difenilpiridina	4,9	
59	trifenilamina	5,7	
60	DDT	6,2	
	Outras substâncias de referência de baixo valor log P_{oa}		
1	ácido nicotínico	- 0,07	

▼B

A.9. PONTO DE INFLAMAÇÃO

1. MÉTODO

1.1. INTRODUÇÃO

É útil possuir informação preliminar sobre a inflamabilidade da substância antes de se efectuar este ensaio. O procedimento de ensaio aplica-se a substâncias líquidas cujos vapores possam ser inflamados por fontes de ignição. Os métodos de ensaio enumerados neste texto são apenas fiáveis para os intervalos de pontos de inflamação especificados nos métodos individuais.

Deve tomar-se em consideração a possibilidade de ocorrência de reacções químicas entre a substância e o suporte da amostra quando se selecciona o método a utilizar.

1.2. DEFINIÇÕES E UNIDADES

O ponto de inflamação é a menor temperatura, corrigida para a pressão de 101,325 kPa, à qual um líquido liberta vapores, sob as condições definidas no método de ensaio, numa quantidade tal que se produz no recipiente de ensaio uma mistura ar/vapor inflamável.

Unidades: ^{o}C

$t = T - 273,15$

(t em ^{o}C e T em K)

1.3. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

Não é necessário utilizar substâncias de referência quando se está a investigar uma nova substância. Essas substâncias servem essencialmente para verificar, de vez em quando, as características de execução do método e para proporcionar a comparação com resultados obtidos com outros métodos.

1.4. PRINCÍPIO DO MÉTODO

Coloca-se a substância no recipiente de ensaio e aquece-se ou arrefece-se até à temperatura de ensaio de acordo com o procedimento descrito no método de ensaio individual. Efectuam-se diversas tentativas para provocar a ignição no sentido de se determinar se a amostra é ou não é inflamável à temperatura de ensaio.

1.5. CRITÉRIOS DE QUALIDADE

1.5.1. **Repetitividade**

A repetitividade varia de acordo com o intervalo de pontos de inflamação e com o método de ensaio utilizado; máximo 2 ^{o}C.

1.5.2. **Sensibilidade**

A sensibilidade depende do método de ensaio utilizado.

1.5.3. **Especificidade**

A especificidade de alguns métodos de ensaio está limitada a certos intervalos de pontos de inflamação e sujeita a dados associados à substância (por exemplo, viscosidade elevada).

▼B

1.6. DESCRIÇÃO DO MÉTODO

1.6.1. **Preparações**

Coloca-se uma amostra da substância de ensaio num aparelho de teste de acordo com 1.6.3.1. e/ou 1.6.3.2.

Por razões de segurança recomenda-se que no caso das substâncias energéticas ou tóxicas se pratique um método que utilize uma pequena quantidade de amostra, cerca de 2 cm^3.

1.6.2. **Condições de ensaio**

Tanto quanto for possível por razões de segurança, o aparelho deverá ser colocado numa posição livre de correntes de ar.

1.6.3. **Realização do ensaio**

1.6.3.1. *Método de equilíbrio*

Ver ISO 1516, ISO 3680, ISO 1523, ISO 3679.

1.6.3.2. *Método de não equilíbrio*

Aparelho de Abel:

Ver BS 2000 parte 170, NF M07-011, NF T66-009.

Aparelho de Abel-Pensky:

Ver EN 57, DIN 51755 parte 1 (para temperaturas entre 5 e 65 °C), DIN 51755 parte 2 (para temperaturas inferiores a 5 °C), NF M07--036.

Aparelho de Tag:

Ver ASTM D 56.

Aparelho de Pensky-Martens:

Ver ISO 2719, EN 11, DIN 51758, ASTM D 93, BS 2000-34, NF M07-019.

Observações:

No caso de se verificar que o ponto de inflamação, determinado por um método de não equilíbrio em 1.6.3.2., possui os valores 0 ± 2 °C, 21 ± 2 °C ou 55 ± 2 °C, deve fazer-se a sua confirmação recorrendo a um método de equilíbrio que utilize o mesmo aparelho.

Apenas os métodos que possam proporcionar os valores de temperatura do ponto de inflamação podem ser utilizados para uma notificação.

Para se determinar o ponto de inflamação de líquidos viscosos (tintas, gomas e análogos) contendo solventes, apenas se pode utilizar aparelhos e métodos de ensaio adequados para a determinação dos pontos de inflamação de líquidos viscosos.

Ver ISO 3679, ISO 3680, ISO 1523, DIN 53213 parte 1.

▼B

2. **RESULTADOS**

3. **RELATÓRIO**

O relatório do ensaio deverá conter, se possível, a informação seguinte:

— a especificação exacta da substância (identificação e impurezas),

— deve especificar-se o método utilizado e bem assim quaisquer desvios possíveis,

— os resultados e quaisquer observações adicionais relevantes para a interpretação dos resultados.

4. **REFERÊNCIAS**

Nenhuma.

▼B

A.10. INFLAMABILIDADE (SÓLIDOS)

1. MÉTODO

1.1. INTRODUÇÃO

Considera-se útil possuir informações preliminares sobre as propriedades potencialmente explosivas da substância antes de se efectuar este ensaio.

Este ensaio apenas deverá ser aplicado a substâncias pulverulentas, granuladas ou pastosas.

No sentido de não se incluírem todas as substâncias que podem ser inflamadas, mas apenas aquelas que ardem rapidamente ou aquelas cuja combustão é de alguma forma especialmente perigosa, apenas as substâncias cuja velocidade de combustão excede um determinado valor limite são consideradas altamente inflamáveis.

Pode ser especialmente perigosa qualquer situação em que a incandescência se propague através de um metal em pó, devido às dificuldades em extinguir o fogo. Os pós de metais deverão ser considerados altamente inflamáveis se permitirem a propagação da incandescência através da sua massa, num intervalo de tempo específico.

1.2. DEFINIÇÃO E UNIDADES

O tempo de combustão exprime-se em segundos.

1.3. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

Não especificadas.

1.4. PRINCÍPIO DO MÉTODO

Dispõe-se a substância numa fita inquebrável ou num rastilho de pó com aproximadamente 250 mm de comprimento e efectua-se um ensaio preliminar para se determinar se ao provocar-se a ignição com uma chama de gás existe propagação por combustão rápida ou por combustão lenta. Se ocorrer a propagação da combustão ao longo de 200 mm do rastilho no decurso de um intervalo específico de tempo, efectua-se seguidamente o programa de ensaio total para se determinar a velocidade de combustão.

1.5. CRITÉRIOS DE QUALIDADE

Não especificados.

▼B

1.6. DESCRIÇÃO DO MÉTODO

1.6.1. **Ensaio preliminar**

Dispõe-se a substância numa fila inquebrável ou num rastilho de pó com aproximadamente 250 mm de comprimento por 20 mm de largura e por 10 mm de altura, sobre uma placa não combustível, não porosa e de fraca condutividade térmica. Aplica-se a uma extremidade do rastilho de pó uma chama de um queimador de gás (diâmetro mínimo de 5 mm) até o pó iniciar a ignição ou durante um período máximo de 2 minutos (5 minutos para pós de metais ou de ligas metálicas). Deve verificar-se se a combustão se propaga ao longo de 200 mm do rastilho no período de tempo do ensaio correspondente a 4 minutos (ou 40 minutos para os pós de metais). No caso de a substância não se inflamar e não houver propagação de combustão, quer por combustão viva, quer por combustão lenta, ao longo de 200 mm do rastilho de pó no período de ensaio correspondente a 4 minutos (ou 40 minutos), então a substância não deverá ser considerada altamente inflamável e não será necessário mais qualquer ensaio. Se a substância propagar a combustão ao longo de 200 mm do rastilho de pó em menos de 4 minutos ou em menos de 40 minutos no caso dos pós de metais, deve dar-se continuidade ao procedimento a seguir descrito (ponto 1.6.2 e seguintes).

1.6.2. **Ensaio da velocidade de combustão**

1.6.2.1. *Preparação*

Enche-se livremente com as substâncias pulverulentas ou granuladas um molde de 250 mm de comprimento com uma secção transversal triangular cuja altura interna é de 10 mm e cuja largura é de 20 mm. De ambos os lados do molde, segundo uma direcção longitudinal, faz-se a montagem de duas placas metálicas que constituem limitações laterais e as quais se projectam 2 mm para além da aresta superior da secção recta triangular (ver figura). Depois deixa-se cair o molde três vezes de uma altura de 2 cm sobre uma superfície sólida. Se necessário completa-se depois o enchimento do molde. Efectua-se depois a remoção das limitações laterais e retira-se o excesso de substância. Na parte superior do molde coloca-se uma placa não combustível, não porosa e de baixa condutividade térmica, inverte-se o aparelho e remove-se o molde.

As substâncias pastosas são dispostas sobre uma placa não combustível, não porosa e de baixa condutividade térmica na forma de um cordão de 250 mm de comprimento possuindo uma secção transversal de aproximadamente 1 cm^2.

1.6.2.2. *Condições de ensaio*

No caso de se tratar de uma substância sensível à humidade o ensaio deverá ser efectuado tão rapidamente quanto possível após a sua remoção do recipiente.

1.6.2.3. *Realização do ensaio*

Coloca-se a pilha numa zona de um sistema de exaustão de fumos.

A velocidade do ar deverá ser suficiente para evitar que os fumos escapem para o interior do laboratório e não deverá variar durante o ensaio. Em torno do aparelho deverá ser instalada uma blindagem em forma de chaminé.

Para iniciar a ignição da pilha numa das suas extremidades utiliza-se uma chama de um queimador de gás (diâmetro mínimo de 5 mm). Depois de a pilha ter ardido numa extensão de 80 mm, mede-se a velocidade de combustão nos 100 mm seguintes.

▼B

Efectua-se o ensaio seis vezes, utilizando-se de cada vez uma placa fria limpa, a não ser que se observe um resultado positivo mais cedo.

2. **RESULTADOS**

O tempo de combustão determinado no ensaio preliminar (1.6.1.) e o tempo mais curto de combustão observado nos seis ensaios (1.6.2.3.) são relevantes para a avaliação.

3. **RELATÓRIO**

3.1. RELATÓRIO DO ENSAIO

O relatório do ensaio deverá conter, se possível, a informação seguinte:

— especificação exacta da substância (identificação e impurezas),

— uma descrição da substância que se pretende ensaiar, o seu estado físico incluindo o teor em humidade,

— os resultados do ensaio preliminar e do ensaio da velocidade de combustão, se tiverem sido efectuados,

— todas as observações adicionais relevantes para a interpretação dos resultados.

3.2. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

As substâncias pulverulentas, granuladas ou pastosas são consideradas altamente inflamáveis no caso de o tempo de combustão em quaisquer ensaios efectuados de acordo com o procedimento de ensaio descrito em 1.6.2. ser inferior a 45 segundos. Os pós de metais ou de ligas metálicas são considerados altamente inflamáveis no caso de poderem ser inflamados e de a chama ou a zona de reacção se propagar a toda a amostra em 10 minutos ou menos.

4. **REFERÊNCIAS**

(1) NF T 20-042 (Sept. 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of solids.

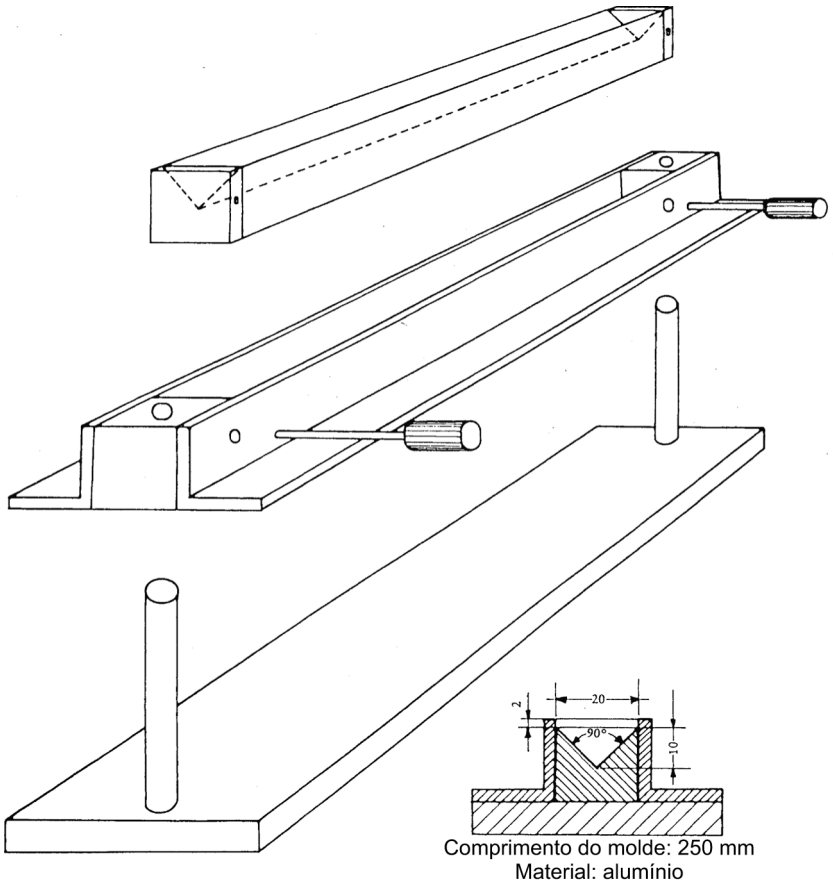
▼B

Apêndice

Figura

Molde e acessórios para a preparação da pilha

(Todas as dimensões estão em milímetros)



▼B

A.11. **INFLAMABILIDADE (GASES)**

1. **MÉTODO**

1.1. INTRODUÇÃO

Este método permite determinar se os gases misturados com ar à temperatura ambiente (cerca de 20 °C) e à pressão atmosférica são inflamáveis e, em caso afirmativo, qual o intervalo de concentrações. As misturas de concentrações crescentes do gás com ar são expostas a uma faísca eléctrica e observa-se a eventual ocorrência de ignição.

1.2. DEFINIÇÃO E UNIDADES

O intervalo de inflamabilidade é o intervalo de concentrações entre os limites inferior e superior de explosão. Os limites inferior e superior de explosão são os limites de concentração do gás inflamável misturado com ar para cujos valores não ocorre a propagação da chama.

1.3. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

Não especificadas.

1.4. PRINCÍPIO DO MÉTODO

Aumenta-se gradualmente a concentração do gás em ar e expõe-se a mistura escalonadamente à acção de uma faísca eléctrica.

1.5. CRITÉRIOS DE QUALIDADE

Não especificados.

1.6. DESCRIÇÃO DO MÉTODO

1.6.1. **Aparelho**

O recipiente de ensaio é um cilindro de vidro colocado em posição vertical, possuindo um diâmetro interno mínimo de 50 mm e uma altura mínima de 300 mm. Os eléctrodos de ignição encontram-se separados por uma distância de 3 a 5 mm e estão colocados 60 mm acima do fundo do cilindro. O cilindro possui uma abertura para a libertação de pressão. O aparelho deve ser protegido por uma blindagem para minimizar quaisquer danos provocados pela explosão.

Como fonte de ignição utiliza-se uma faísca de indução com a duração de 0,5 segundo, que é gerada por um transformador de alta tensão com uma tensão de saída compreendida entre 10 e 15 kV (potência máxima de entrada da ordem de 300 W). Na referência (2) encontra-se descrito um exemplo de um aparelho adequado.

1.6.2. **Condições de ensaio**

O ensaio deve ser efectuado à temperatura ambiente (cerca de 20 °C).

▼B

1.6.3. **Realização do ensaio**

Utilizando bombas doseadoras introduz-se no cilindro de vidro uma concentração conhecida de gás em ar. Provoca-se uma faísca na mistura e verifica-se se ocorre ou não a existência de uma chama que se separa da fonte de ignição e se propaga independentemente. Faz-se variar a concentração do gás por escalões de 1 % em volume até que haja ocorrência de ignição conforme anteriormente descrito.

No caso de a estrutura química do gás indicar que poderá ser eventualmente não inflamável e de se poder calcular a composição da mistura estequiométrica com ar, apenas será necessário ensaiar em escalões de 1 % misturas compreendidas no intervalo entre 10 % menos do que a composição estequiométrica e 10 % mais do que essa composição.

2. **RESULTADOS**

A ocorrência de propagação da chama é a única informação relevante para a determinação desta propriedade.

3. **RELATÓRIO**

O relatório do ensaio deverá conter, se possível, a informação seguinte:

— a especificação exacta da substância (identificação e impurezas),

— uma descrição, com dimensões, do aparelho utilizado,

— a temperatura a que se efectuou o ensaio,

— as concentrações de ensaio e os resultados obtidos,

— o resultado do ensaio: gás não inflamável ou gás altamente inflamável,

— no caso de se ter concluído que o gás é não inflamável, deverá especificar-se então o intervalo de concentrações no qual foi ensaiado em escalões de 1 %,

— toda a informação e observações relevantes para a interpretação dos resultados.

4. **REFERÊNCIAS**

(1) NF T 20-041 (Sept. 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of gases.

(2) W. Berthold, D. Conrad, T. Grewer, H. Grosse-Wortmann, T. Redeker und H.Schacke. «Entwicklung einer Standard-Apparatur zur Messung von Explosionsgrenzen». Chem.-Ing.-Tech. 1984, vol. 56, 2, p. 126-127.

▼B

A.12. INFLAMABILIDADE (CONTACTO COM ÁGUA)

1. MÉTODO

1.1. INTRODUÇÃO

Este método de ensaio pode ser utilizado para se determinar se a reacção de uma substância com água ou com ar húmido origina o desenvolvimento de quantidades perigosas de um gás ou de gases que possam ser altamente inflamáveis.

O método de ensaio pode ser aplicado tanto a substâncias sólidas como a substâncias líquidas. Este método não é aplicável a substâncias cuja ignição seja espontânea quando em contacto com o ar.

1.2. DEFINIÇÕES E UNIDADES

Altamente inflamável: substâncias que em contacto com água ou com ar húmido libertam gases altamente inflamáveis em quantidades perigosas numa proporção mínima de 1 litro/kg por hora.

1.3. PRINCÍPIO DO MÉTODO

Ensaia-se a substância de acordo com os passos sequenciais adiante descritos: se ocorrer ignição em qualquer desses passos não é necessário continuar o ensaio. No caso de se saber já que a substância não reage violentamente com a água, prosseguir com o passo 4 (1.3.4.).

1.3.1. **Passo 1**

Coloca-se a substância de ensaio numa tina contendo água destilada à temperatura de 20°C e verifica-se se ocorre ou não o início da combustão do gás libertado.

1.3.2. **Passo 2**

Coloca-se a substância de ensaio sobre uma folha de papel de filtro flutuando sobre a superfície da água destilada contida num prato, à temperatura de 20 °C, e observa-se se ocorre ou não o início da combustão do gás libertado. O papel de filtro destina-se apenas a manter a substância num determinado local para aumentar as probabilidades de ocorrência de ignição.

1.3.3. **Passo 3**

Com a substância de ensaio prepara-se uma pilha com aproximadamente 2 cm de altura e 3 cm de diâmetro. Verte-se nessa pilha algumas gotas de água e observa-se se há ou não ocorrência de início de combustão do gás libertado.

1.3.4. **Passo 4**

Mistura-se a substância a ensaiar com água destilada à temperatura de 20 °C e mede-se a velocidade de libertação de gás durante um período de sete horas, em intervalos de uma hora. Se essa taxa de libertação de gás for errática ou no caso de ser crescente decorridas as sete horas, deverá prolongar-se o tempo de medição até ao máximo de cinco dias. O ensaio pode ser interrompido se em qualquer momento essa taxa exceder 1 litro/kg por hora.

▼B

1.4. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

Não especificadas.

1.5. CRITÉRIOS DE QUALIDADE

Não especificados.

1.6. DESCRIÇÃO DOS MÉTODOS

1.6.1. **Passo 1**

1.6.1.1. *Condições de ensaio*

Efectua-se o ensaio à temperatura ambiente (cerca de 20 °C).

1.6.1.2. *Realização do ensaio*

Deve-se colocar uma pequena quantidade (aproximadamente com 2 mm de diâmetro) da substância de ensaio numa tina contendo água destilada. Deve-se anotar (i) qualquer eventual libertação de gás e (ii) a eventual ocorrência de ignição do gás. No caso de ocorrer ignição do gás não é necessário continuar o ensaio da substância uma vez que esta é considerada perigosa.

1.6.2. **Passo 2**

1.6.2.1. *Aparelho*

Utiliza-se um papel de filtro flutuando sobre a superfície de água destilada contida em qualquer recipiente adequado, por exemplo, um prato de evaporação com o diâmetro de 100 mm.

1.6.2.2. *Condições de ensaio*

Efectua-se o ensaio à temperatura ambiente (cerca de 20 °C).

1.6.2.3. *Realização do ensaio*

Coloca-se no centro da folha de papel de filtro uma pequena quantidade da substância de ensaio (aproximadamente com 2 mm de diâmetro). Deve-se anotar se ocorre (i) qualquer eventual libertação de gás e (ii) se ocorre ignição desse gás. Se ocorrer a ignição do gás não é necessário continuar o ensaio da substância, uma vez que esta é considerada perigosa.

1.6.3. **Passo 3**

1.6.3.1. *Condições de ensaio*

Efectua-se o ensaio à temperatura ambiente (cerca de 20 °C).

1.6.3.2. *Realização do ensaio*

Com a substância de ensaio prepara-se uma pilha com aproximadamente 2 cm de altura e 3 cm de diâmetro com um entalhe na parte superior. Verte-se na perfuração algumas gotas de água e verifica-se (i) se ocorre eventualmente qualquer libertação de gás e (ii) se ocorre ignição desse gás. Se ocorrer ignição do gás não é necessário continuar o ensaio da substância uma vez que esta é considerada perigosa.

▼B

1.6.4. **Passo 4**

1.6.4.1. *Aparelho*

O aparelho tem a configuração que se mostra na figura.

1.6.4.2. *Condições de ensaio*

Procede-se a uma inspecção da embalagem para verificação da existência de pó (dimensão das partículas < 500 μm) da substância de ensaio. Se o pó constituir mais do que 1 % p/p do total, ou se a amostra for friável, então dever-se-á triturar toda a substância reduzindo-a a pó antes do ensaio de modo a proporcionar uma redução das dimensões das partículas durante o armazenamento e o manuseamento; caso contrário faz-se o ensaio da substância tal como foi recebida. O ensaio deverá ser efectuado à temperatura ambiente (cerca de 20°C) e à pressão atmosférica.

1.6.4.3. *Realização do ensaio*

Coloca-se 10 a 20 ml de água no funil de gotejamento do aparelho e coloca-se 10 g de substância no frasco cónico. Pode-se medir o volume de gás libertado recorrendo a meios adequados. Abre-se a torneira do funil de gotejamento para deixar entrar a água no frasco cónico e põe-se em funcionamento um cronómetro. Mede-se a libertação de gás em cada hora durante um período de sete horas. No caso da libertação de gás durante esse período ser errática ou no caso de no fim desse período a taxa de libertação de gás ser crescente, então dever-se-á continuar a efectuar medições durante cinco dias. Se em qualquer momento do período de medição a taxa de libertação de gás exceder 1 litro/kg por hora pode-se interromper o ensaio. Este ensaio deverá ser efectuado em triplicado.

No caso de ser desconhecida a identidade do gás, deve-se proceder a uma análise desse gás. No caso de o gás conter componentes altamente inflamáveis e de não se saber se a mistura global é altamente inflamável, deve-se preparar uma mistura da mesma composição e ensaiar-se de acordo com o método A.11.

2. **RESULTADOS**

A substância é considerada perigosa se:

— ocorrer ignição espontânea em qualquer passo do procedimento de ensaio,

ou

— ocorrer libertação de gás inflamável a uma taxa superior a 1 litro/kg de substância por hora.

3. **RELATÓRIO**

O relatório do ensaio deverá conter, se possível, a informação seguinte:

— a especificação exacta da substância (identificação e impurezas),

— pormenores sobre qualquer preparação inicial da substância de ensaio,

▼B

— os resultados dos ensaios (passos 1, 2, 3 e 4),

— a identidade química do gás libertado,

— a taxa de libertação de gás no caso de se realizar o passo 4 (1.6.4.),

— quaisquer observações adicionais relevantes para a interpretação dos resultados.

4. **REFERÊNCIAS**

(1) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Test and Criteria, 1990, United Nations, New York.

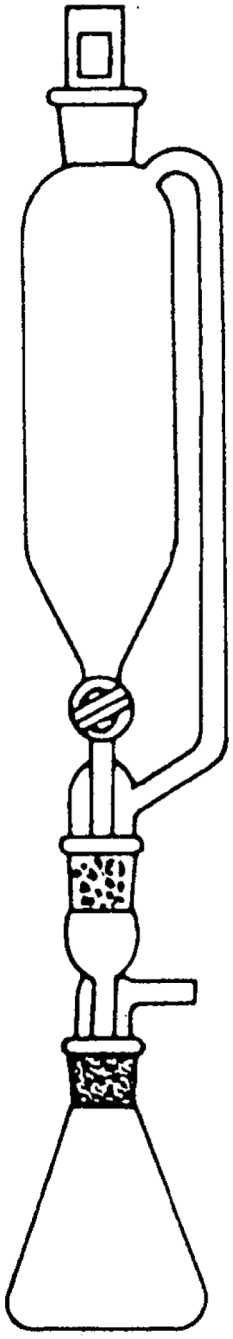
(2) NF T 20-040 (Sept. 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of gases formed by the hydrolysis of solid and liquid products.

▼B

Apêndice

Figura

Aparelho



▼B

A.13 PROPRIEDADES PIROFÓRICAS DE SÓLIDOS E LÍQUIDOS

1. MÉTODO

1.1. INTRODUÇÃO

O procedimento de ensaio é aplicável a substâncias sólidas ou líquidas as quais, em pequenas quantidades, entram espontaneamente em combustão, decorrido um curto período de tempo após estarem em contacto com o ar à temperatura ambiente (cerca de 20 °C).

As substâncias que necessitem de estar expostas ao ar durante diversas horas ou dias, à temperatura ambiente ou a temperaturas elevadas, antes que ocorra a ignição, não estão abrangidas por este método.

1.2. DEFINIÇÕES E UNIDADES

Considera-se que uma substância possui propriedades pirofóricas se entrar em combustão ou se carbonizar sob as condições descritas em 1.6.

Pode ser necessário ensaiar também a auto-inflamabilidade de líquidos utilizando o método A.15 relativo à temperatura de auto-ignição (líquidos e gases).

1.3. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

Não especificadas.

1.4. PRINCÍPIO DO MÉTODO

Adiciona-se a substância, no estado sólido ou no estado líquido, a um veículo inerte e coloca-se em contacto com o ar à temperatura ambiente durante um período de cinco minutos. Se as substâncias líquidas não se inflamarem utiliza-se papel de filtro para as absorver e faz-se a exposição ao ar à temperatura ambiente (cerca de 20 °C) durante cinco minutos. No caso de uma substância sólida ou líquida se inflamar, ou no caso de um líquido se inflamar ou carbonizar uma folha de papel de filtro, então considera-se que essa substância é pirofórica.

1.5. CRITÉRIOS DE QUALIDADE

Repetitividade: devido à importância que assumem as questões relativas à segurança, um único resultado positivo é suficiente para que essa substância seja considerada pirofórica.

1.6. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.6.1. **Aparelho**

Utiliza-se um vaso de porcelana com cerca de 10 cm de diâmetro e enche-se com terra de diatomáceas até cerca de 5 mm de altura, à temperatura ambiente (cerca de 20 °C).

Nota:

A terra de diatomáceas ou quaisquer outras substâncias inertes comparáveis geralmente disponíveis deverão ser consideradas como representativas do solo onde a substância de ensaio possa ser derramada em caso de acidente.

É necessário papel de filtro seco para ensaiar os líquidos que não se inflamem em contacto com o ar quando estão em contacto com um veículo inerte.

▼B

1.6.2. **Realização do ensaio**

a) *Sólidos pulverulentos*

De uma altura de cerca de 1 m deixa-se cair 1 a 2 cm^3 da substância pulverulenta que se pretende ensaiar, sobre uma superfície não combustível e verifica-se a eventualidade dessa substância se inflamar durante a queda ou decorridos cinco minutos em repouso.

Efectua-se o ensaio seis vezes, salvo no caso de se observar combustão.

b) *Líquidos*

Verte-se no vaso de porcelana cerca de 5 cm^3 do líquido que se pretende ensaiar e observa-se a eventual inflamação da substância no período de cinco minutos.

Se não houver inflamação nos seis ensaios, executam-se os ensaios seguintes:

Com o auxílio de uma seringa coloca-se 0,5 ml da amostra de ensaio num papel de filtro recortado e observa-se a eventual ocorrência de inflamação ou de carbonização do papel de filtro nos cinco minutos subsequentes à adição do líquido. Efectua-se o ensaio três vezes, salvo se ocorrer inflamação ou carbonização.

2. **RESULTADOS**

2.1. TRATAMENTO DOS RESULTADOS

Pode interromper-se o processo de ensaio logo que ocorra um resultado positivo em qualquer dos ensaios.

2.2. AVALIAÇÃO

Se a substância se inflama no período de cinco minutos após ter sido adicionada a um veículo inerte e exposta ao ar, ou se uma substância líquida carboniza ou inflama um papel de filtro no período de cinco minutos após a adição e exposição ao ar, então considera-se que é pirofórica.

3. **RELATÓRIO**

O relatório do ensaio deverá conter, se possível, a informação seguinte:

— a especificação exacta da substância (identificação e impurezas),

— os resultados dos ensaios,

— quaisquer observações adicionais relevantes para a interpretação dos resultados.

4. **REFERÊNCIAS**

(1) NF T 20-039 (Sept. 85). Chemical products for industrial use. Determination of the spontaneous flammability of solids and liquids.

(2) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Test and Criteria, 1990, United Nations, New York.

▼B

A.14. **PROPRIEDADES EXPLOSIVAS**

1. **MÉTODO**

1.1. INTRODUÇÃO

O método proporciona um sistema de ensaio para se determinar se uma substância sólida ou pastosa representa perigo de explosão quando submetida ao efeito de uma chama (sensibilidade térmica) ou quando submetida a choque ou fricção (sensibilidade a estímulos mecânicos) e se uma substância líquida representa perigo de explosão quando submetida ao efeito de uma chama ou choque.

O método decompõe-se em três partes:

a) Um ensaio de sensibilidade térmica (1);

b) Um ensaio de sensibilidade mecânica relativamente ao choque (1);

c) Um ensaio de sensibilidade mecânica relativamente à fricção (1).

O método proporciona dados para se avaliar a possibilidade de se iniciar uma explosão por meio de diversos estímulos comuns. O método não pretende garantir que uma substância seja susceptível de explodir sob quaisquer condições.

O método é apropriado para se determinar se uma substância representa perigo de explosão (sensibilidade térmica e mecânica) sob as condições particulares especificadas na directiva. Esse método baseia-se em diversos tipos de aparelhos amplamente utilizados à escala internacional (1) e os quais proporcionam normalmente resultados significativos. Admite-se que o método não é definitivo. É possível utilizar aparelhos alternativos aos especificados desde que sejam internacionalmente aceites e desde que os resultados possam ser adequadamente correlacionados com os que se obtêm com o aparelho especificado.

Não é necessário efectuar os ensaios quando existir informação termodinâmica disponível (por exemplo, calor de formação, calor de decomposição) e/ou a ausência de diversos grupos reactivos (2) na fórmula estrutural permitir concluir, para além de quaisquer dúvidas razoáveis, que a substância é incapaz de sofrer decomposição rápida com libertação de gases ou libertação de calor (isto é, o material não representa qualquer risco de explosão). No caso dos líquidos não é necessário qualquer ensaio de sensibilidade mecânica relativamente à fricção.

1.2. DEFINIÇÕES E UNIDADES

Explosivo:

Substâncias que possam explodir sob o efeito de uma chama ou que sejam sensíveis ao choque ou à fricção no aparelho especificado (ou que sejam mecanicamente mais sensíveis do que o 1,3--dinitrobenzeno num aparelho alternativo).

1.3. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

O 1,3-dinitrobenzeno, produto cristalino técnico, peneirado de modo a poder passar por uma malha de 0,5 mm, no caso do método por fricção e choque.

A perhidro-l,3,5-trinitro-l,3,5-triazina (RDX, hexogéneo, ciclonite — CAS 121-82-4), cuja recristalização é feita a partir de uma solução aquosa de ciclohexanona, peneirada a húmido através de uma malha de 250 μm e retida num peneiro de malha de 150 μm, fazendo-se a secagem a 103 ± 2 °C (durante 4 horas) para a segunda série de ensaios de fricção e choque.

▼B

1.4. PRINCÍPIO DO MÉTODO

São necessários ensaios preliminares para se determinar as condições de segurança para a realização dos três ensaios de sensibilidade.

1.4.1. **Segurança na realização dos ensaios (3)**

Por razões de segurança, antes de se efectuarem os ensaios principais submetem-se amostras muito pequenas (cerca de 10 mg) da substância a aquecimento em ambiente não confinado, com uma chama de gás, à acção de choque em qualquer aparelho conveniente e à acção de fricção recorrendo à utilização de um malhete contra uma bigorna ou recorrendo à utilização de qualquer máquina de fricção. O objectivo consiste em determinar se a substância é tão sensível e explosiva que os ensaios de sensibilidade prescritos, particularmente o ensaio de sensibilidade térmica, devam ser efectuados com precauções especiais de modo a evitar ferimentos no operador.

1.4.2. **Sensibilidade térmica**

O método implica o aquecimento da substância num tubo de aço, tapado por placas perfuradas com furos de diferentes diâmetros, no sentido de se determinar se a substância é susceptível de explodir sob condições de aquecimento intenso e confinamento definido.

1.4.3. **Sensibilidade mecânica (choque)**

O método consiste em submeter a substância ao choque provocado por uma massa determinada caindo de uma altura determinada.

14.4. **Sensibilidade mecânica (fricção)**

O método consiste em submeter substâncias sólidas ou pastosas à fricção entre superfícies normalizadas sob condições específicas de carga e de movimento relativo.

1.5. CRITÉRIOS DE QUALIDADE

Não especificados.

1.6. DESCRIÇÃO DO MÉTODO

1.6.1. **Sensibilidade térmica (efeito de uma chama)**

1.6.1.1. *Aparelho*

O aparelho é constituído por um tubo de aço não reutilizável com o seu dispositivo de fecho reutilizável (figura 1), instalado num dispositivo de aquecimento e de protecção. Cada tubo é constituído por folha de aço de estiramento profundo (ver apêndice) e possui um diâmetro interno de 24 mm, um comprimento de 75 mm e paredes com espessura de 0,5 mm. Os tubos possuem uma flange na extremidade aberta para permitir que sejam fechados pelo corpo da placa perfurada. Esse corpo é constituído por uma placa perfurada resistente à pressão, possuindo um furo central, presa firmemente a um tubo por meio de uma peça roscada de duas partes (porca e manga roscada). A porca e a manga roscada são feitas de aço de crómio e manganés (ver apêndice), que não produz faíscas até à temperatura de 800 ^{o}C. As placas perfuradas possuem 6 mm de espessura, são feitas de aço resistente ao calor (ver apêndice) e encontram-se disponíveis com perfurações de diversos diâmetros.

▼B

1.6.1.2. *Condições de ensaio*

Normalmente ensaia-se a substância tal como é recebida, embora em alguns casos a substância após trituração seja, por exemplo, comprimida, moldada ou aglomerada por qualquer outra forma, necessária para o ensaio.

No caso dos sólidos determina-se a massa de material a utilizar em cada ensaio recorrendo a um procedimento experimental a seco em dois andares. Enche-se com 9 cm^3 de substância um tubo de tara determinada e carrega-se a substância com uma força de 80 N aplicada a toda a secção transversal do tubo. Por razões de segurança ou nos casos em que a forma física da amostra possa ser modificada por compressão, pode recorrer-se a outros procedimentos de enchimento; por exemplo, se a substância for muito sensível à fricção o enchimento pelo método de embuchar não é apropriado. Se o material for compressível adiciona-se mais e carrega-se enchendo-se o tubo até à distância de 55 mm medida a partir da parte superior. Determina-se a massa total utilizada para encher o tubo até àquele nível de 55 mm e adiciona-se mais duas porções carregando-se qualquer delas com a força de 80 N. Depois, ou se adiciona mais material ou se retira, conforme necessário, deixando o tubo cheio até ao nível de 15 mm medidos a partir da parte superior. Realiza-se uma segunda experiência a seco, começando com uma quantidade carregada correspondente a um terço da massa total determinada na primeira experiência a seco. Adiciona-se mais duas porções dessas utilizando uma força de 80 N e ajusta-se o nível da substância no tubo até à distância de 15 mm, medida desde a parte superior, por adição ou por subtracção de material conforme necessário. A quantidade de sólido determinada na segunda experiência a seco é utilizada para cada ensaio; o enchimento efectua-se com três quantidades iguais, qualquer delas comprimida até ao volume de 9 cm^3 utilizando-se a força que for necessária (isto pode ser facilitado utilizando anéis espaçadores).

Os líquidos e os geles são carregados no tubo até à altura de 60 mm tomando-se precauções particulares com os geles para se evitar a formação de espaços ocos. Faz-se deslizar a manga roscada pelo tubo, pela parte de baixo, insere-se a placa perfurada apropriada e aperta-se a porca depois de se ter aplicado um pouco de lubrificante à base de dissulfureto de molibdénio. É essencial verificar que não haja quaisquer vestígios de substância retida entre a flange e a placa, ou nas roscas.

O aquecimento é proporcionado por uma chama de gás propano obtido em garrafa de gás industrial, equipada com um regulador de pressão (60 a 70 mbar), que passa através de uma válvula calibradora e é distribuído uniformemente (conforme indicado por observação visual das chamas dos queimadores) a quatro queimadores através de um cano distribuidor. Os queimadores estão localizados em torno da câmara de ensaio conforme se mostra na figura 1. Os quatro queimadores conjuntamente possuem um consumo de aproximadamente 3,2 litros de propano por minuto. É possível utilizar outros queimadores e gases combustíveis alternativos mas o regime de aquecimento deve ser conforme especificado na figura 3. Para todos os aparelhos o regime de aquecimento deve ser verificado periodicamente utilizando tubos cheios com ftalato de dibutilo conforme se indica na figura 3.

1.6.1.3. *Realização dos ensaios*

Cada ensaio é efectuado até o tubo se fragmentar ou até o tubo ter sido aquecido durante cinco minutos. Um ensaio que tenha como consequência a fragmentação do tubo em três ou mais partes, as quais podem em alguns casos ser unidas umas às outras utilizando estreitas fitas de metal, conforme se ilustra na figura 2, é considerado do tipo explosivo. Um ensaio que tenha como consequência menos fragmentos ou ausência de fragmentação é considerado como sendo do tipo não explosivo.

▼B

Efectua-se primeiro uma série de três ensaios com uma placa cujo diâmetro do orifício seja de 6,0 mm e se não se obtiver qualquer explosão efectua-se uma segunda série de três ensaios com uma placa cujo diâmetro do orifício seja de 2,0 mm. Se ocorrer uma explosão durante quaisquer das séries de ensaio, não é necessário efectuar mais ensaios.

1.6.1.4. *Avaliação*

Considera-se que o resultado do ensaio é positivo se ocorrer uma explosão em qualquer das anteriores séries de ensaios.

1.6.2. **Sensibilidade mecânica (choque)**

1.6.2.1. *Aparelho (figura 4)*

As partes essenciais de um aparelho de martelo cadente típico são um bloco de aço moldado com base, bigorna, coluna, guias, massas cadentes, dispositivo de libertação e um suporte para a amostra. A bigorna de aço de 100 mm (diâmetro) × 70 mm (altura) é enroscada à parte superior de um bloco de aço de 230 mm (comprimento) × 250 mm (largura) × 200 mm (altura) com uma base moldada de 450 mm (comprimento) × 450 mm (largura) × 60 mm (altura). Num suporte aparafusado à parte posterior do bloco de aço prende-se uma coluna feita de tubo de aço estirado sem juntas. Quatro parafusos prendem o aparelho a um sólido bloco de cimento de 60 × 60 × 60 cm de tal modo que as guias são absolutamente verticais e a massa cadente cai livremente. Existem disponíveis para utilização massas de 5 e 10 kg, feitas de aço. A cabeça batente de cada massa é feita de aço duro, HRC 60 a 63, e possui um diâmetro mínimo de 25 mm.

A amostra de ensaio é encerrada num dispositivo de choque constituído por dois cilindros de aço coaxiais, um sobre o outro, num guia de aço cilíndrico e oco. Os cilindros de aço deverão possuir um diâmetro de 10 (- 0,003, - 0,005) mm e uma altura de 10 mm e deverão possuir superfícies polidas, arestas arredondadas (raio de curvatura de 0,5 mm) e uma dureza de HRC 58 a 65. O cilindro oco deve possuir um diâmetro externo de 16 mm, um furo polido de 10 (+ 0,005, + 0,010) mm e uma altura de 13 mm. O dispositivo de choque é montado numa bigorna intermédia (26 mm de diâmetro e 26 mm de altura) feita de aço e centrada por um anel com perfurações para permitir o escape dos fumos.

1.6.2.2. *Condições de ensaio*

O volume da amostra deverá ser de 40 mm^3 ou um volume que se ajuste a qualquer aparelho alternativo. As substâncias no estado sólido deverão ser testadas devidamente secas e preparadas do modo seguinte:

a) As substâncias pulverizadas são peneiradas (malha com dimensões de 0,5 mm); toda a substância que passar pelo peneiro é utilizada no ensaio;

b) As substâncias comprimidas, moldadas ou aglomeradas por qualquer outra forma são partidas em pequenas partes e peneiradas; a fracção peneirada com diâmetros compreendidos entre 0,5 e 1 mm é usada no ensaio e deverá ser representativa da substância original.

As substâncias normalmente fornecidas em pasta deverão ser ensaiadas no estado seco, quando possível, ou depois de remover a quantidade máxima possível de diluente. As substâncias líquidas são ensaiadas com o intervalo de 1 mm entre os cilindros de aço superior e inferior.

▼B

1.6.2.3. *Realização dos ensaios*

Realiza-se uma série de seis ensaios deixando cair uma massa de 10 kg, de uma altura de 0,4 m (40 J). Se ocorrer uma explosão durante os seis ensaios para o valor de 40 J deve realizar-se outra série de seis ensaios deixando cair uma massa de 5 kg e de uma altura de 0,15 m (7,5 J). Noutros aparelhos compara-se a amostra com a substância de referência escolhida utilizando um procedimento reconhecido (por exemplo, técnica de sobe-e-desce, etc.).

1.6.2.4. *Avaliação*

Considera-se positivo o resultado do ensaio se ocorrer uma explosão (o aparecimento súbito de uma chama e/ou uma repercussão é equivalente a uma explosão) pelo menos uma vez em qualquer dos ensaios com o aparelho de choque especificado ou considera-se que a amostra é mais sensível do que o composto 1,3-dinitrobenzeno ou RDX num ensaio de choque alternativo.

1.6.3. **Sensibilidade mecânica (fricção)**

1.6.3.1. *Aparelho (figura 5)*

O aparelho de fricção é constituído por uma placa de base de aço moldado sobre a qual se monta o dispositivo de fricção. Este é constituído por uma cavilha de porcelana fixa e por uma placa de porcelana móvel. A placa de porcelana é suportada por uma armação que desliza em duas guias. A armação é ligada a um motor eléctrico através de uma biela de ligação, um ressalto excêntrico e uma engrenagem adequada de tal modo que a placa de porcelana se move, uma vez apenas, para trás e para diante por baixo da cavilha de porcelana numa distância de 10 mm. A carga da cavilha de porcelana é de 120 a 360 newtons, por exemplo.

As placas lisas de porcelana são feitas de porcelana branca (rugosidade de 9 a 32 μm) e possuem as dimensões de 25 mm (comprimento) × 25 mm (largura) × 5 mm (altura). A cavilha cilíndrica de porcelana é feita também de porcelana branca e tem 15 mm de comprimento, possui um diâmetro de 10 mm e na extremidade esférica rugosa possui superfícies com um raio de curvatura de 10 mm.

1.6.3.2. *Condições de ensaio*

O volume da amostra deverá ser de 10 mm^3 ou um volume ajustado a qualquer aparelho alternativo.

As substâncias sólidas são ensaiadas devidamente secas e preparadas do modo seguinte:

a) As substâncias pulverizadas são peneiradas (com malha de 0,5 mm); utiliza-se no ensaio toda a substância que passe através do peneiro;

b) As substâncias comprimidas, moldadas ou aglomeradas por qualquer outra forma são partidas em peças pequenas e peneiradas; utiliza-se para o ensaio a fracção peneirada de diâmetro < 0,5 mm.

As substâncias normalmente fornecidas em pasta deverão ser ensaidas no estado seco, quando possível. Se a substância não pode ser preparada no estado seco, a pasta (depois de removida a quantidade máxima possível de diluente) é ensaiada na forma de uma película com 0,5 mm espessura, 2 mm de largura e 10 mm de comprimento preparada com uma matriz.

▼B

1.6.3.3. *Realização dos ensaios*

Coloca-se a cavilha de porcelana sobre a amostra submetida ao ensaio e aplica-se a carga. Ao efectuar-se o ensaio, as marcas esponjosas da placa de porcelana devem ficar transversais à direcção do movimento. Devem ser tomadas precauções para que a cavilha se ajuste sobre a amostra, para que haja material de ensaio suficiente sob a cavilha e também para que a placa se mova correctamente sob a cavilha. Para as substâncias pastosas utiliza-se um calibrador com 0,5 mm de espessura e com uma fenda de 2 × 10 mm para se aplicar a substância à placa. A placa de porcelana tem de se mover 10 mm para diante e para trás sob a cavilha de porcelana no tempo de 0,44 segundos. Cada parte da superfície da placa e da cavilha deve ser utilizada apenas uma vez; as duas extremidades de cada cavilha servirão para duas experiências e as duas superfícies de uma placa servirão, cada uma delas, para três experiências.

Efectua-se uma série de seis ensaios com uma carga de 360 N. Se ocorrer um evento positivo durante estes seis ensaios deve ser efectuada outra série de seis ensaios com uma carga de 120 N. Com outros aparelhos compara-se a amostra com a substância de referência escolhida utilizando um procedimento consagrado (por exemplo, técnica de sobe-e-desce, etc.).

1.6.3.4. *Avaliação*

Considera-se positivo o resultado do ensaio se ocorrer uma explosão (a crepitação e/ou uma repercussão ou o aparecimento súbito de uma chama são equivalentes a uma explosão) pelo menos uma vez em qualquer dos ensaios com o aparelho de fricção especificado ou se for satisfeito um critério equivalente num ensaio de fricção alternativo.

2. **RESULTADOS**

Em princípio considera-se que uma substância representa perigo de explosão no sentido da directiva se for obtido um resultado positivo no ensaio de sensibilidade térmica, de choque ou de fricção.

3. **RELATÓRIO**

3.1. RELATÓRIO DO ENSAIO

O relatório do ensaio deverá conter, se possível, a informação seguinte:

— identidade, composição, pureza, teor em humidade, etc., da substância ensaiada,

— a forma física da amostra e o facto eventual de ter sido triturada, quebrada e/ou peneirada,

— as observações durante os ensaios de sensibilidade térmica (por exemplo, a massa da amostra, o número de fragmentos, etc.),

— as observações efectuadas durante os ensaios de sensibilidade mecânica (por exemplo, a formação de quantidades consideráveis de fumos ou a decomposição completa sem repercussão, chamas, faíscas, crepitação, etc.),

— os resultados de cada tipo de ensaio,

— no caso de se ter utilizado um aparelho alternativo, o relatório deverá conter a justificação científica e também a evidência de correlação entre os resultados obtidos com o aparelho especificado e os resultados obtidos com o aparelho equivalente,

▼B

— quaisquer comentários úteis tais como as referências em ensaios com produtos idênticos e que possam ser relevantes para uma interpretação adequada dos resultados,

— todas as observações adicionais relevantes para a interpretação dos resultados.

3.2. INTERPRETAÇÃO E AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS

O relatório do ensaio deverá mencionar quaisquer resultados que sejam considerados falsos, anómalos ou não representativos. Se for necessário deduzir quaisquer dos resultados deverá descrever-se uma explicação e os resultados de ensaios alternativos ou complementares. Salvo nos casos em que possa ser explicado um resultado anómalo, deve aceitar-se o valor nominal e utilizar-se esse valor para classificar a substância em conformidade.

4. **REFERÊNCIAS**

(1) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods: Tests and Criteria, 1990, United Nations, New York.

(2) Bretherick, L., Handbook of Reactive Chemical Hazards, 4th edition, Buttcrworths, London, ISBN 0-750-60103-5, 1990.

(3) Koenen, H., Ide, K.H. and Swart, K.H., Explosivstoffe, 1961, vol. 3, p. 6-13 and p. 30-42.

(4) NF T 20-038 (Sept. 85). Chemical products for industrial use — Determination of explosion risk.

▼B

Apêndice

Exemplo de especificação de material para o ensaio de sensibilidade térmica (ver DIN 1623)

(1) Tubo: especificação de material nº 1.0336.505 g.

(2) Placa perfurada: especificação de material n.º 1.4873

(3) Manga roscada e porca: especificação de material n.º 1.3817.

Figura 1

Aparelho para o ensaio da sensibilidade térmica

(Todas as dimensões estão em milímetros)

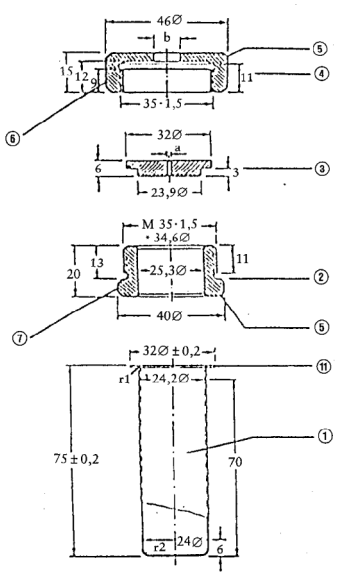


Figura 1a Tubo de aço e acessórios

(1) tubo
(1a) flange exterior
(2) manga roscada; rosca de baixa fricção
(3) placa perfurada a = 2,0 ou 6,0 mm de diâmetro
(4) porca b = 10 mm de diâmetro
(5) superfície chanfrada
(6) 2 cabeças chatas para chave 41

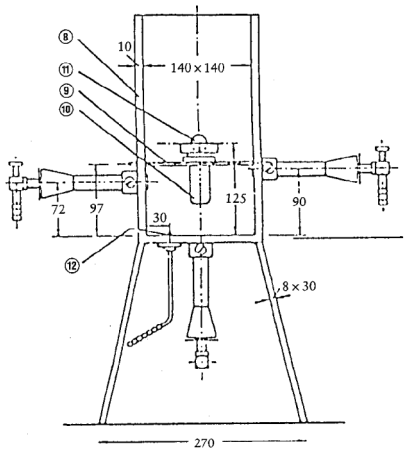


Figura 1b Dispositivo de aquecimento e protecção

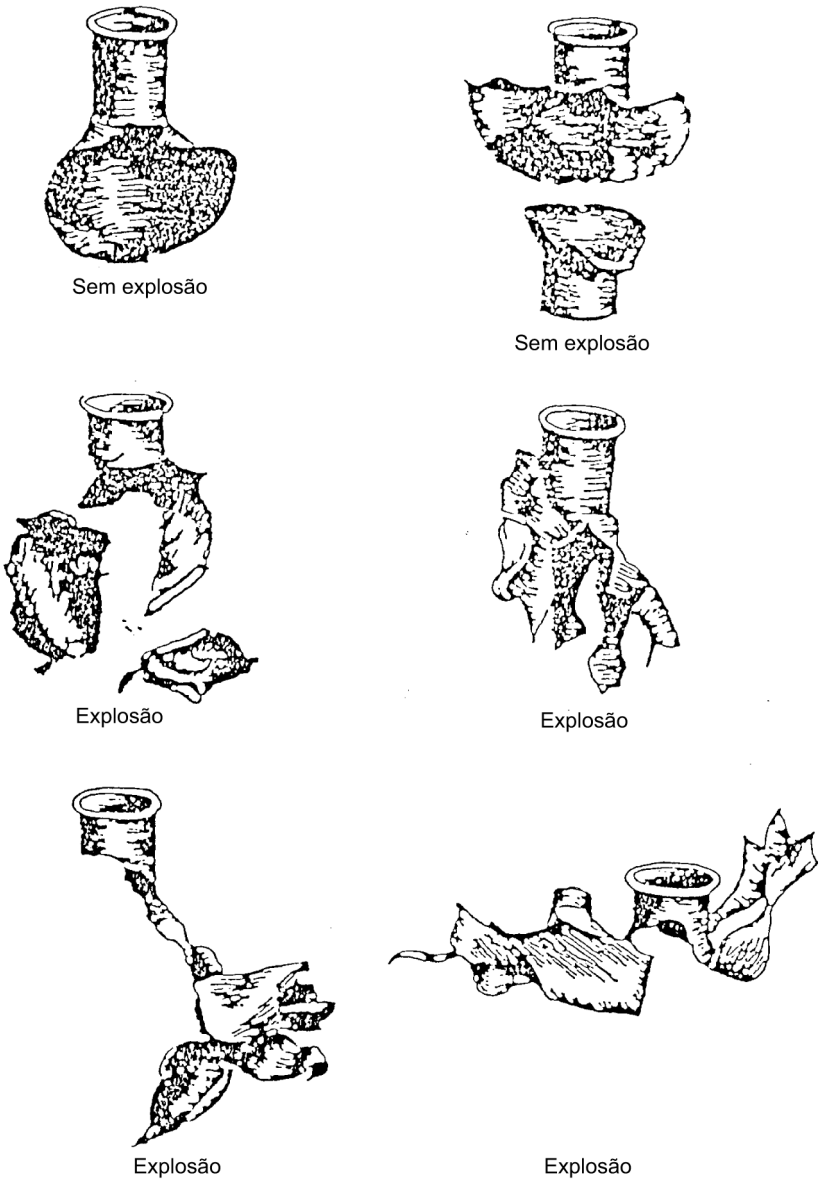
(7) 2 cabeças chatas para chave 36
(8) caixa à prova de estilhaços
(9) 2 tirantes de suporte para tubo
(10) tubo montado
(11) posição do queimador posterior: os outros queimadores estão visíveis
(12) jacto orientador

▼B

Figura 2

Ensaio de sensibilidade térmica

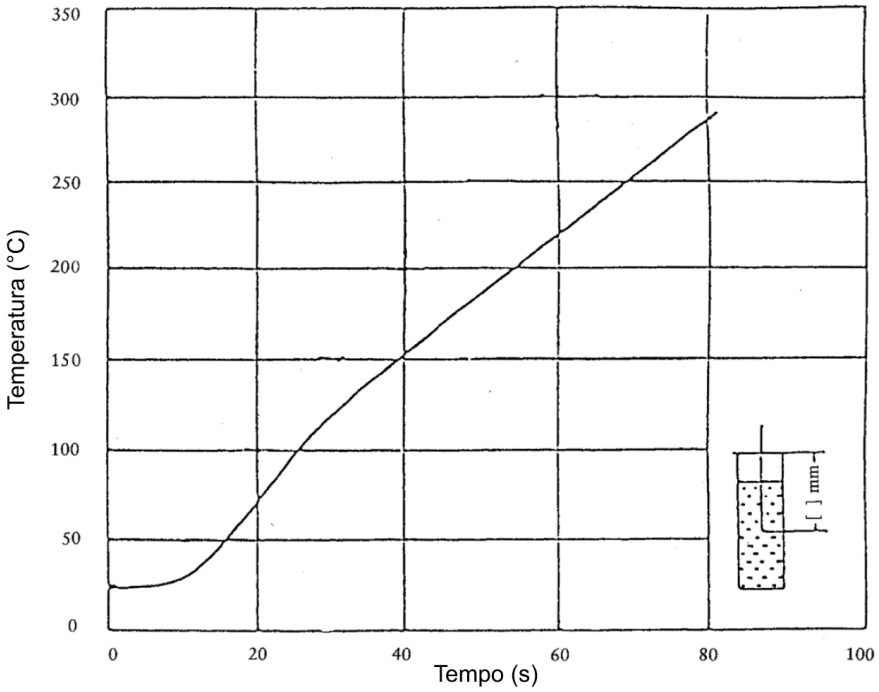
Exemplos de fragmentação



▼B

Figura 3

Calibração da taxa de aquecimento para o ensaio da sensibilidade térmica



Curva de temperatura/tempo obtida ao aquecer-se ftalato de dibutilo (27 cm3) num tubo fechado (placa com orifício de 1,5 mm) utilizando gás propano com o débito de 3,2 litros/minuto. Mede-se a temperatura com um termopar de 1 mm de diâmetro feito de crómio/alumínio revestido com aço inoxidável, colocado centralmente 43 mm sob o aro do tubo. A taxa de aquecimento entre 135 °C e 285 °C deverá estar compreendida entre 185 e 215 K/minuto.

▼B

Figura 4

Aparelho para o ensaio de choque

(Todas as dimensões estão em milímetros)

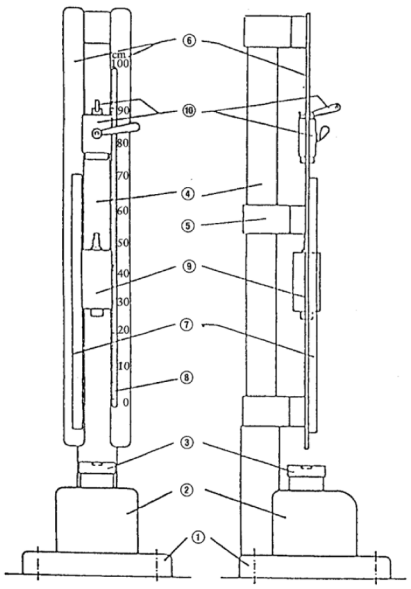


Figura 4a Martelo cadente, alçado e vista geral

(1) base, 450 x 450 x 60
(2) bloco de aço, 230 x 250 x 200
(3) bigorna, 100 de diâmetro x 70
(4) coluna
(5) componente transversal médio
(6) 2 guias
(7) armário denteado

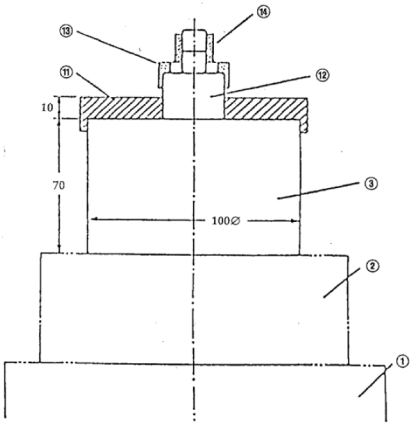


Figura 4b Martelo cadente, parte lateral vista lateral,

(8) escala graduada
(9) martelo cadente (massa cadente)
(10) dispositivo de sustentação e de libertação
(11) placa de fixação
(12) bigorna intermédia (permutável), 26 de diâmetro x 26
(13) anel de fixação com orifícios
(14) dispositivo de impacte

▼B

Figura 4

Continuação

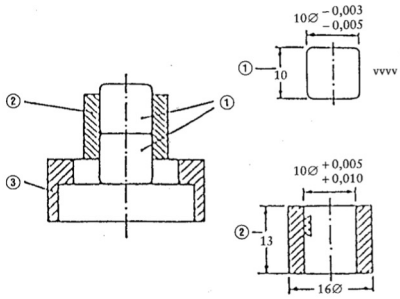
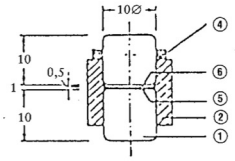


Figura 4c Dispositivo para o ensaio de choque de substâncias pulverizadas ou pastas

Figura 4d Dispositivo para o ensaio de choque de substâncias líquidas



(1) cilindros de aço
(2) anel guia para os cilindros de aço
(3) anel de fixação com orifícios
a) secção vertical
b) planta
(4) anel de borracha
(5) substância líquida (40 mm^3)
(6) espaço livre de líquido

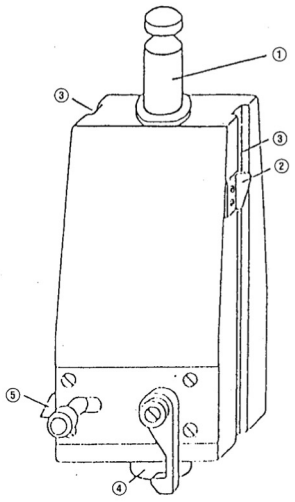


Figura 4e Martelo (massa cadente de 5 kg)

(1) espigão de suspensão
(2) marcador de altura
(3) sulco de fixação
(4) cabeça de impacte cilíndrica
(5) lingueta de ricochete

▼B

Figura 5

Sensibilidade à fricção: aparelho

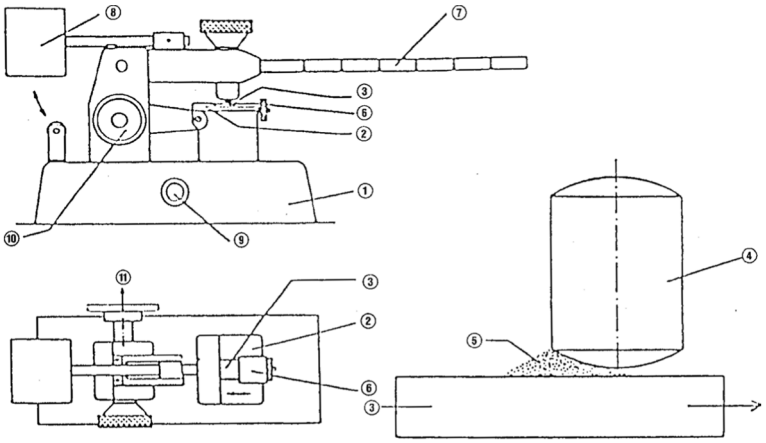


Figura 5a Aparelho de fricção: alçado e planta

(1) base de aço
(2) carro móvel
(3) placa de porcelana, 25 x 25 x 5 mm, presa ao carro
(4) cavilha fixa de porcelana, 10 mm de diâmetro x 15 mm
(5) amostra de ensaio, aproximadamente 10 mm^3

Figura 5b Posição de arranque da cavilha na amostra

(6) suporte da cavilha
(7) braço de carga
(8) contrapeso
(9) interruptor
(10) roda para alinhar o carro na posição de partida
(11) saída para o motor eléctrico

▼B

A.15. TEMPERATURA DE AUTO-IGNIÇÃO (LÍQUIDOS E GASES)

1. MÉTODO

1.1. INTRODUÇÃO

As substâncias explosivas e as substâncias que sofrem ignição espontânea em contacto com o ar à temperatura ambiente não devem ser submetidas a este ensaio. O procedimento de ensaio é aplicável a gases, líquidos e vapores, que, na presença de ar, podem ser inflamados por uma superfície quente.

A temperatura de auto-ignição pode ser consideravelmente reduzida pela presença de impurezas catalíticas, pela superfície do material ou pelo facto de o recipiente de ensaio ter um volume superior.

1.2. DEFINIÇÕES E UNIDADES

O grau de propensão para a auto-ignição exprime-se em termos de temperatura de auto-ignição. A temperatura de auto-ignição é a menor temperatura para a qual a substância de ensaio se inflama quando misturada com ar sob as condições definidas no método de ensaio.

1.3. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

As substâncias de referência estão enumeradas nas normas (ver 1.6.3.). Devem servir essencialmente para a calibração do método, de vez em quando, e para permitir a comparação com resultados obtidos com outros métodos.

1.4. PRINCÍPIO DO MÉTODO

O método permite a determinação da temperatura mínima da superfície interior de um recinto fechado à qual ocorre a ignição de um gás, vapor ou líquido injectados nesse recinto fechado.

1.5. CRITÉRIOS DE QUALIDADE

A repetitividade varia de acordo com o intervalo de temperaturas de auto-ignição e com o método de ensaio utilizado,

A sensibilidade e a especificidade dependem do método de ensaio utilizado.

1.6. DESCRIÇÃO DO MÉTODO

1.6.1. **Aparelho**

O aparelho encontra-se descrito no método referido em 1.6.3.

1.6.2. **Condições de ensaio**

O ensaio de uma amostra da substância efectua-se de acordo com o método referido em 1.6.3.

1.6.3. **Realização do ensaio**

Ver IEC 79-4, DIN 51794, ASTM-E 659-78, BS 4056, NF T 20-037.

▼B

2. **RESULTADOS**

Regista-se a temperatura de ensaio, a pressão atmosférica, a quantidade de amostra utilizada e o intervalo de tempo decorrido até à ocorrência da ignição.

3. **RELATÓRIO**

O relatório do ensaio deverá conter, se possível, a informação seguinte:

— a especificação exacta da substância (identificação e impurezas),

— a quantidade de amostra utilizada,

— a pressão atmosférica,

— o aparelho utilizado,

— os resultados das medições (temperaturas de ensaio, resultados relativos à ignição, correspondentes intervalos de tempo),

— todas as observações adicionais relevantes para a interpretação dos resultados.

4. **REFERÊNCIAS**

Nenhuma.

▼B

A.16. TEMPERATURA DE AUTO-1GNIÇÃO RELATIVA PARA OS SÓLIDOS

1. MÉTODO

1.1. INTRODUÇÃO

As substâncias explosivas e as substâncias que se inflamam espontaneamente em contacto com o ar à temperatura ambiente não deverão ser submetidas a este ensaio.

O objectivo deste ensaio consiste em proporcionar informação preliminar sobre a auto-inflamabilidade de substâncias sólidas a temperaturas elevadas.

Se o calor desenvolvido por reacção da substância com oxigénio ou por decomposição exotérmica não for perdido para o meio envolvente com rapidez suficiente, ocorre o fenómeno de auto-aquecimento que conduz à auto-ignição. Em consequência, a auto-ignição ocorre sempre que a razão de produção de calor excede a razão da perda de calor.

O procedimento de ensaio é útil como pesquisa preliminar para as substâncias sólidas. Dada a natureza complexa da ignição e da combustão de sólidos, a temperatura de auto-ignição determinada de acordo com este método apenas deverá ser utilizada para efeitos de comparação.

1.2. DEFINIÇÕES E UNIDADES

A temperatura de auto-ignição obtida por este método é a temperatura ambiente mínima expressa em^{o}C à qual se inflamará um determinado volume de substância sob condições definidas.

1.3. SUBSTÂNCIA DE REFERÊNCIA

Nenhuma.

1.4. PRINCÍPIO DO MÉTODO

Coloca-se num forno, à temperatura ambiente, um determinado volume de substância a ensaiar; traça-se uma curva temperatura/tempo relativa às condições no centro da amostra, aumentando-se a temperatura do forno até 400^{o}C ou até ao ponto de fusão da substância se for menor, à razão de 0,5^{o}C/minuto. Para os objectivos deste ensaio, a temperatura do forno para a qual a temperatura da amostra é de 400^{o}C por auto-aquecimento é designada por temperatura de auto-ignição.

1.5. CRITÉRIOS DE QUALIDADE

Nenhum.

1.6. DESCRIÇÃO DO MÉTODO

1.6.1. **Aparelho**

1.6.1.1. *Forno*

Utiliza-se um forno de laboratório de temperatura programada (com o volume aproximado de dois litros) equipado com sistema de circulação de ar natural e com sistema para aliviar os efeitos da explosão. No sentido de se evitar um potencial risco de explosão, não se deverá permitir que quaisquer gases de decomposição estabeleçam contacto com os componentes eléctricos do sistema de aquecimento.

▼B

1.6.1.2. *Cubo de rede de arame*

De acordo com o diagrama da figura 1 prepara-se uma peça de rede de arame de aço inoxidável com aberturas de 0,045 mm. A rede deverá ser dobrada e presa com arame no interior de cubos abertos por cima.

1.6.1.3. *Termopares*

Termopares adequados.

1.6.1.4. *Registador*

Utiliza-se qualquer registador de dois canais calibrado de 0 a 600°C ou calibrado para a tensão correspondente.

1.6.2. **Condições de ensaio**

As substâncias são ensaiadas tal qual são recebidas.

1.6.3. **Realização do ensaio**

Enche-se o cubo com a substância de ensaio e bate-se suavemente adicionando-se mais substância até o cubo estar completamente cheio. Depois suspende-se o cubo no centro do forno, à temperatura ambiente. Coloca-se um termopar no centro do cubo e coloca-se outro entre o cubo e a parede do forno para registar a temperatura deste.

As temperaturas do forno e da amostra são registadas continuamente ao mesmo tempo que a temperatura do forno aumenta até 400°C ou até ao ponto de fusão da substância, se for inferior, à razão de 0,5°C/minuto.

Ao ocorrer a ignição da substância o termopar da amostra indicará uma subida muito rápida da temperatura, superior à temperatura do forno.

2. **RESULTADOS**

A temperatura do forno à qual a temperatura da amostra atinge 400°C por auto-aquecimento é relevante para a avaliação (ver figura 2).

3. **RELATÓRIO**

O relatório do ensaio deverá, se possível, conter a informação seguinte:

— uma descrição da substância a ensaiar,

— os resultados da medição, incluindo a curva temperatura/tempo,

— todas as observações adicionais relevantes para a interpretação dos resultados.

4. **REFERÊNCIAS**

(1) NF T 20-036 (Sept. 85). Chemical products for industrial use. Determination of the relative temperature of the spontaneous flammability of solids.

▼B

Figura 1

Planificação do cubo de ensaio com 20 mm de aresta

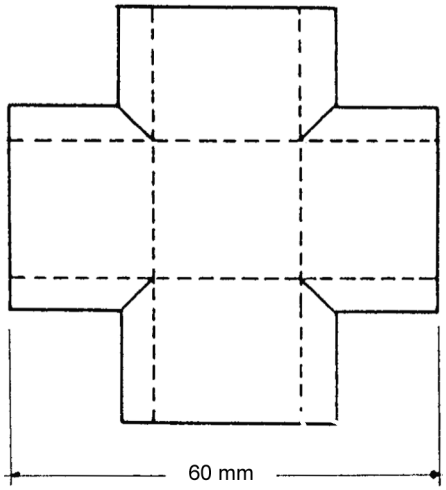
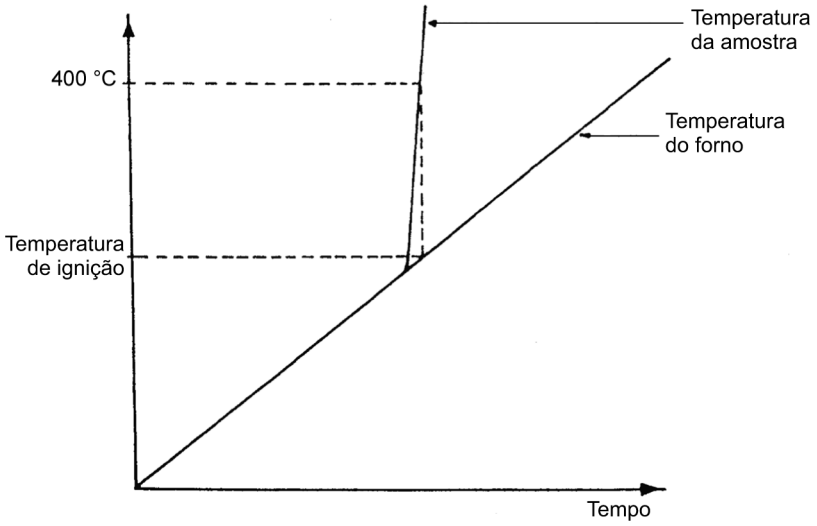


Figura 2

Curva típica de temperatura/tempo



▼B

A.17. PROPRIEDADES OXIDANTES (SÓLIDOS)

1. MÉTODO

1.1. INTRODUÇÃO

É útil possuir informações preliminares sobre quaisquer potenciais propriedades explosivas da substância antes de se efectuar este ensaio.

Este ensaio não é aplicável a líquidos, gases, substâncias explosivas ou altamente inflamáveis ou peróxidos orgânicos.

Não é necessário efectuar este ensaio no caso de o exame da fórmula estrutural determinar, para além de qualquer dúvida razoável, que a substância é incapaz de reagir exotermicamente com um material combustível.

No sentido de se determinar se o ensaio deve ser efectuado com precauções especiais, dever-se-á efectuar um ensaio preliminar.

1.2. DEFINIÇÕES E UNIDADES

Tempo de combustão: é o tempo de reacção, em segundos, necessário para a zona de reacção se deslocar ao longo de uma pilha utilizando o procedimento descrito em 1.6.

Velocidade de combustão: expressa em milímetros por segundo.

Velocidade máxima de combustão: é o valor máximo das velocidades de combustão obtidas com misturas contendo entre 10 % e 90 % em peso do oxidante.

1.3. SUBSTÂNCIA DE REFERÊNCIA

Utiliza-se o nitrato de bário (qualidade analítica) como substância de referência para o ensaio e para o ensaio preliminar.

A mistura de referência é uma mistura de nitrato de bário com pó de celulose preparada de acordo com 1.6., que possui a velocidade máxima de combustão (normalmente é uma mistura contendo nitrato de bário na proporção de 60 % em peso).

1.4. PRINCÍPIO DO MÉTODO

Por razões de segurança, efectua-se um ensaio preliminar. Não é necessário mais nenhum ensaio no caso de se verificar claramente no ensaio preliminar que a substância de ensaio possui propriedades oxidantes. Se não for esse o caso, a substância deverá ser então submetida ao ensaio completo.

No ensaio completo mistura-se, segundo proporções variáveis, a substância que se pretende ensaiar e uma substância combustível previamente definida. Depois forma-se uma pilha com cada mistura e procede-se à ignição dessa pilha numa das suas extremidades. A velocidade máxima de combustão determinada é então comparada com a velocidade máxima de combustão da mistura de referência.

1.5. CRITÉRIOS DE QUALIDADE

Se necessário, é válido qualquer método de trituração e de mistura desde que a diferença entre as velocidades máximas de combustão em seis ensaios separados não se afastem do valor correspondente à média aritmética em mais do que 10 %.

▼B

1.6. DESCRIÇÃO DO MÉTODO

1.6.1. **Preparação**

1.6.1.1. *Substância de ensaio*

Reduz-se a amostra de ensaio a partículas com dimensões < 0,125 mm utilizando o procedimento seguinte: peneira-se a substância de ensaio, tritura-se a parte restante e repete-se o procedimento até toda a substância de ensaio passar pelo peneiro.

Pode-se utilizar qualquer método de trituração e de crivagem que satisfaçam os critérios qualitativos.

Antes da preparação da mistura seca-se a substância à temperatura de 105 °C, até se obter um peso constante. No caso de a temperatura de decomposição da substância de ensaio ser inferior a 105 °C, torna-se necessário secar a substância a uma temperatura inferior adequada.

1.6.1.2. *Substância combustível*

Utiliza-se pó de celulose como substância combustível. A celulose deverá ser do tipo utilizado para a cromatografia de camada fina ou para a cromatografia em coluna. Verificou-se que é adequada a celulose em que 85 % das fibras possui um comprimento compreendido entre 0,020 e 0,075 mm. Faz-se passar o pó de celulose através de um peneiro de malha de 0,125 mm. Em todo o ensaio deve-se utilizar o mesmo lote de celulose.

Antes de se preparar a mistura efectua-se a secagem do pó de celulose à temperatura de 105 °C até se obter um peso constante.

No caso de se utilizar serradura no ensaio preliminar faz-se a preparação dessa serradura de madeira macia recolhendo a porção que passa através de um peneiro de malha de 1,6 mm, mistura-se muito bem e depois seca-se à temperatura de 105°C durante 4 horas numa camada com espessura inferior a 25 mm. Arrefece-se e armazena-se num recipiente estanque ao ar, tão cheio quanto for possível, de preferência ao fim de 24 horas de secagem.

1.6.1.3. *Fonte de ignição*

Como fonte de ignição deve utilizar-se uma chama de um queimador de gás (com diâmetro mínimo de 5mm). No caso de se utilizar outra fonte de ignição (por exemplo, quando se efectua o ensaio em atmosfera inerte), deverá constar do relatório uma descrição e a justificação.

1.6.2. **Realização do ensaio**

Nota:

As misturas de oxidantes com celulose ou com serradura devem ser tratadas como potencialmente explosivas e manuseadas com as devidas precauções.

1.6.2.1. *Ensaio preliminar*

Mistura-se muito bem a substância seca com a celulose ou com a serradura seca na proporção em peso de duas partes da substância de ensaio para uma parte de celulose ou de serradura e com essa mistura prepara-se uma pequena pilha com a configuração de um cone com as dimensões de 3,5 cm (diâmetro da base) × 2,5 cm (altura) enchendo, sem bater, uma forma com a configuração do cone (por exemplo, um funil de vidro de laboratório com o bico tapado).

▼B

Coloca-se essa pilha sobre uma placa fria, não combustível, não porosa e de fraca condutividade térmica. O ensaio deve ser efectuado num aparador com exaustão de fumos tal como em 1.6.2.2.

Coloca-se a fonte de ignição em contacto com o cone. Observa-se e regista-se o vigor e a duração da reacção resultante.

Considera-se que a substância é um oxidante se a reacção for vigorosa.

Em qualquer caso em que o resultado suscite dúvidas é necessário completar depois a sequência de ensaio adiante descrita.

1.6.2.2. *Sequência de ensaio*

Procede-se à preparação de misturas oxidante/celulose contendo oxidante em proporções compreendidas entre 10 % e 90 % em peso, por acrescimentos sucessivos de 10 %. Nos casos limite, deve utilizar-se misturas intermédias de oxidante/celulose para se obter com maior precisão a velocidade máxima de combustão.

A configuração da pilha é conseguida por meio de um molde. Esse molde é feito de metal, tem um comprimento de 250 mm e uma secção recta transversal com uma altura interior de 10 mm e com uma largura interior de 20 mm. De ambos os lados do molde, segundo a direcção longitudinal, faz-se a montagem de duas placas metálicas que constituem limitações laterais que ultrapassam 2 mm a aresta superior da secção recta triangular (ver figura). Enche-se livremente este dispositivo com um ligeiro excesso de mistura. Depois de se deixar cair o molde uma vez, de uma altura de 2 cm sobre uma superfície sólida, remove-se a substância em excesso remanescente com uma folha colocada em posição oblíqua, procede-se à remoção das limitações laterais e alisa-se o pó restante utilizando um cilindro. Depois coloca-se sobre o molde uma placa não combustível, não porosa e de fraca condutibilidade térmica, inverte-se o aparelho e remove-se o molde.

Coloca-se a placa sob o exaustor de um aparador com exaustão de fumos.

A velocidade do ar deverá ser suficiente para evitar que os fumos escapem para o interior do laboratório e não deverá variar durante o ensaio. Em torno do aparelho deverá instalar-se uma blindagem auxiliar da exaustão.

Devido às propriedades higroscópicas da celulose e de algumas substâncias que se pretendem ensaiar o teste deverá ser efectuado tão rapidamente quanto possível.

Inflama-se uma extremidade da pilha por contacto com a chama.

Mede-se o tempo de reacção para uma distância de 200 mm após a zona de reacção se ter propagado, segundo uma distância inicial de 30 mm.

Efectua-se o ensaio com a substância de referência e pelo menos com cada uma das misturas de substância de ensaio com celulose, no intervalo definido.

No caso de se verificar que a velocidade máxima de combustão é significativamente superior à da mistura de referência, pode-se interromper o ensaio; caso contrário, deve-se repetir o ensaio cinco vezes para cada uma das três misturas que proporcionam a velocidade de combustão mais rápida.

▼B

No caso de se suspeitar que o resultado é falsamente positivo, deve-se repetir o ensaio utilizando uma substância inerte com partículas de dimensões idênticas, tal como a diatomite, em vez de celulose. Em alternativa deve-se ensaiar novamente a mistura de substância de ensaio/celulose que possui a velocidade de combustão mais rápida em atmosfera inerte (teor em oxigénio < 2 % v/v).

2. **RESULTADOS**

Por razões de segurança deve-se considerar a velocidade máxima de combustão — em vez do valor médio — como sendo a propriedade oxidante característica da substância de ensaio.

Para a avaliação é relevante o valor máximo da velocidade de combustão obtido numa série de seis ensaios para uma determinada mistura.

Traça-se um gráfico do valor máximo da velocidade de combustão para cada mistura em função da concentração do oxidante. A partir de gráfico conclui-se sobre a velocidade máxima de combustão.

Os seis valores de velocidade de combustão medidos numa experiência efectuada com a mistura de máxima velocidade de combustão não devem diferir do valor da média aritmética em mais do que 10 %; caso contrário, devem aperfeiçoar-se os métodos de trituração e de mistura.

A velocidade máxima de combustão obtida é comparada com a velocidade máxima de combustão da mistura de referência (ver 1.3.).

Se os ensaios forem efectuados em atmosfera inerte, compara-se a velocidade máxima de reacção com a que se obtém com a mistura de referência em atmosfera inerte.

3. **RELATÓRIO**

3.1. RELATÓRIO DO ENSAIO

O relatório do ensaio deverá conter, se possível, a informação seguinte:

— identidade, composição, pureza, teor em humidade, etc., da substância ensaiada,

— qualquer tratamento da substância de ensaio (por exemplo, trituração, secagem, etc.),

— a fonte de ignição utilizada nos ensaios,

— os resultados das medições,

— o modo de reacção (por exemplo, combustão com chama à superfície, combustão através de toda a massa, qualquer informação relativa aos produtos de combustão, etc.),

— todas as observações adicionais relevantes para a interpretação dos resultados, incluindo uma descrição do vigor (chamas, faíscas, fumos, combustão lenta, etc.) e duração aproximada observados no ensaio preliminar sobre segurança/pesquisa, tanto para a substância de ensaio como para a substância de referência,

— os resultados dos ensaios com uma substância inerte, se existirem,

— os resultados dos ensaios em atmosfera inerte, se existirem.

▼B

3.2. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Considera-se que uma substância é um oxidante nos casos em que:

a) No ensaio preliminar se observa uma reacção vigorosa;

b) No ensaio completo, a velocidade máxima de combustão das misturas ensaiadas é superior ou igual à velocidade máxima de combustão da mistura de referência constituída por celulose e nitrato de bário.

No sentido de se evitar um resultado positivo falso, os resultados obtidos ao fazer-se o ensaio da substância misturada com um material inerte e/ou ao fazer-se o ensaio sob atmosfera inerte deverão ser considerados também ao fazer-se a interpretação dos resultados.

4. **REFERÊNCIAS**

(1) NF T 20-035 (Sept. 85). Chemical products for industrial use. Determination of the oxidizing properties of solids.

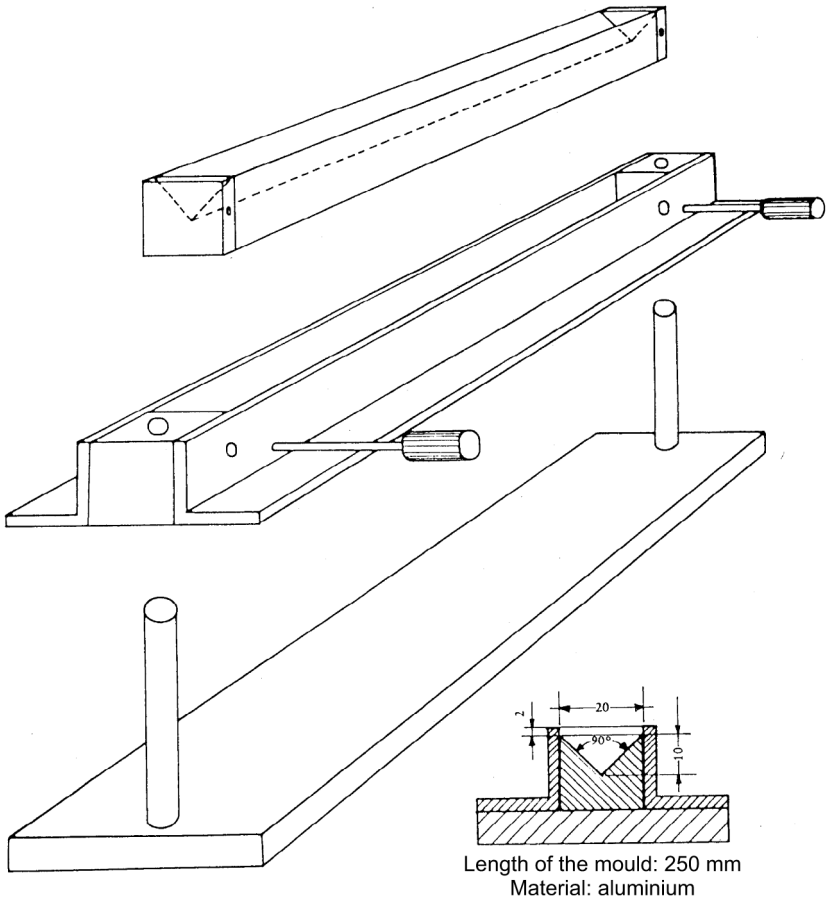
▼B

Apêndice

Figura

Molde e acessórios para a preparação da pilha

(Todas as dimensões estão em milímetros)



▼B

A.18. **MASSA MOLECULAR MÉDIA EM FUNÇÃO DO NÚMERO DE MOLES E DISTRIBUIÇÃO DA MASSA MOLECULAR EM POLÍMEROS**

1. **MÉTODO**

O presente método, que utiliza a cromatografia de permeação em gel (GPC), é idêntico ao método OCDE TG 118 (1996). Os respectivos fundamentos e outras informações técnicas são apresentados na referência (1).

1.1. INTRODUÇÃO

Tendo em conta a diversidade das propriedades dos biopolímeros, torna-se impossível descrever um único método que estabeleça de modo preciso as condições de separação e avaliação dos mesmos, abrangendo todas as possibilidades e especificidades. Muitos sistemas poliméricos complexos, nomeadamente, não são analisáveis por cromatografia de permeação em gel. Nos casos em que o recurso a esta técnica não se afigure viável, a massa molecular pode ser determinada através de outros métodos (ver apêndice), devendo documentar-se e justificar-se a opção utilizada.

O método descrito baseia-se na norma DIN 55672 (1); esta última contém informações pormenorizadas sobre o modo de execução do ensaio e a avaliação dos respectivos resultados. Caso seja necessário alterar determinadas condições do processo experimental, deve apresentar-se a devida justificação. Podem utilizar-se outras normas, na condição de apresentar as respectivas referências. O método descrito utiliza, para fins de calibração, amostras de poliestireno de polidispersibilidade conhecida, podendo ser necessário efectuar alterações de modo a torná-lo adequado a determinados polímeros, nomeadamente polímeros hidrossolúveis e polímeros reticulados de cadeia longa.

1.2. DEFINIÇÕES E UNIDADES

A massa molecular média em função do número de moles, M_n, e a massa molecular média relativa à massa das espécies, M_w, são determinadas por recurso às equações:

$$M_n = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i / M_i} \qquad M_w = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i \times M_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i}$$

em que:

H_i é a intensidade do sinal do detector correspondente ao volume de retenção V_i, contado a partir da linha de base,

M_i é a massa molecular da fracção do polímero correspondente ao volume de retenção V_i e

n é o número de pontos obtidos experimentalmente.

A amplitude da distribuição de massas moleculares, que constitui uma medida da dispersibilidade do sistema, é dada pelo quociente M_w/M_n

▼B

1.3. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

Uma vez que a cromatografia de permeação em gel constitui um método relativo, deve efectuar-se uma calibração. Para tal, podem utilizar-se padrões de poliestireno de cadeia linear, com uma distribuição limitada, e massas moleculares médias (M_n e M_w) e distribuição de massas moleculares conhecidas. A curva de calibração apenas pode ser utilizada na determinação da massa molecular da amostra desconhecida caso as condições de separação da referida amostra e dos padrões tenham sido seleccionadas de modo idêntico.

Uma determinada relação entre a massa molecular e o volume de eluição apenas é válida nas condições específicas de cada ensaio. Estas últimas incluem, nomeadamente, a temperatura, o tipo de solvente (ou mistura de solventes), as condições cromatográficas e a coluna ou sistema de colunas de separação.

As massas moleculares da amostra determinadas pelo método em causa constituem valores relativos, sendo designadas «massas moleculares em equivalentes de poliestireno». Tal facto significa que as massas moleculares podem apresentar desvios relativamente aos valores absolutos em função das diferenças estruturais e químicas entre a amostra e os padrões. Caso se utilizem outros padrões, nomeadamente polietilenoglicol, óxido de polietileno, metracrilato de polimetilo ou ácido poliacrílico, devem justificar-se os motivos.

1.4. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

A determinação da distribuição das massas moleculares, bem como das massas moleculares médias da amostra (M_n, M_w), pode fazer-se por recurso à cromatografia de permeação em gel, que consiste numa variante da cromatografia líquida em que a amostra é separada em função dos volumes hidrodinâmicos dos diversos componentes (2).

A separação é efectuada por passagem através de uma coluna cujo enchimento consiste num material poroso, de modo geral um gel orgânico. As moléculas de dimensões mais reduzidas passam através dos poros, sendo as restantes excluídas. A fixação das moléculas de maiores dimensões é, pois, menor, sendo eluídas em primeiro lugar. As moléculas de dimensões médias passam através de alguns poros, sendo eluídas numa fase posterior. Finalmente, as moléculas de dimensões mais reduzidas, que possuem um raio hidrodinâmico inferior ao dos poros do gel, penetram estes últimos, sendo eluídas em último lugar.

Em condições ideais, a separação é determinada apenas pelas dimensões das moléculas, embora, na prática, seja difícil evitar algumas interferências devidas à adsorção. A não uniformidade do enchimento e a existência de volumes mortos poderão induzir problemas complementares (2).

A detecção pode ser efectuada com base no índice de refracção ou por absorção no ultravioleta, originando uma curva de distribuição simples. Todavia, de modo a atribuir valores de massa molecular aos vários pontos da curva, é necessário efectuar uma calibração por recurso a polímeros de massa molecular conhecida e, se possível, de estrutura similar, nomeadamente padrões de poliestireno. A curva resultante da representação gráfica da quantidade, em massa, das diversas espécies eluídas em função do logaritmo da massa molecular deve exibir uma distribuição de Gauss, por vezes distorcida por uma ligeira assimetria na região das massas moleculares mais reduzidas.

▼B

1.5. CRITÉRIOS DE QUALIDADE

A repetibilidade (desvio-padrão relativo) do volume de eluição deve ser superior a 0,3 %. Se um cromatograma elaborado em função do tempo não corresponder aos critérios *supra*, deve assegurar-se a necessária repetibilidade da análise mediante correcção por recurso a um padrão interno (1). As polidispersões dependem da massa molecular de cada padrão. No caso da utilização de padrões de poliestireno, os valores característicos são os seguintes:

$M_p < 2\,000$	$M_w/M_n < 1{,}20$
$2\,000 \leq M_p \leq 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}05$
$M_p > 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}20$

em que M_p representa a massa molecular do padrão correspondente ao máximo do pico.

1.6. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.6.1. **Preparação das soluções-padrão de poliestireno**

Os padrões de poliestireno são dissolvidos, com agitação, no eluente escolhido. Na preparação das soluções devem ter-se em conta as recomendações do fabricante.

As concentrações dos padrões dependem de vários factores, nomeadamente o volume de injecção, a viscosidade da solução e a sensibilidade do detector. Deve adaptar-se o volume de injecção máximo ao comprimento da coluna, de modo a evitar uma sobrecarga. Os volumes de injecção característicos de separações analíticas por cromatografia de permeação em gel com uma coluna de 30 cm × 7,8 mm situam-se, de modo geral, entre 40 e 100 µl. É possível injectar volumes superiores, que não devem, contudo, exceder 250 µl. Antes de calibrar a coluna, deve determinar-se o rácio adequado volume de injecção/concentração.

1.6.2. **Preparação da solução de amostra**

De modo geral, as condições atrás referidas são também aplicáveis à preparação das soluções de amostra. Esta última é dissolvida num solvente adequado, nomeadamente tetra-hidrofurano (THF), sob agitação cuidadosa. Em caso algum deverá utilizar-se um banho de ultra-sons. Se necessário, a solução de amostra pode ser purificada por passagem através de um filtro de membrana, cujos poros deverão ter dimensões compreendidas entre 0,2 e 2 µm.

Deve referir-se no relatório final a eventual presença de partículas não dissolvidas, que poderão conter espécies de massa molecular superior. Deve utilizar-se um método adequado para determinar a percentagem ponderal das partículas em causa. As soluções devem ser utilizadas nas 24 horas subsequentes à sua preparação.

1.6.3. **Equipamento**

— Reservatório de solvente,

— desgaseificador (se adequado),

— bomba,

▼B

— amortecedor de pulsações (se adequado),

— sistema de injecção,

— colunas cromatográficas,

— detector,

— medidor de caudal (se adequado),

— sistema de registo e processamento de dados,

— recipiente para resíduos.

Deve assegurar-se o carácter inerte do sistema cromatográfico em relação aos solventes utilizados (nomeadamente no caso da utilização de capilares de aço com THF).

1.6.4. **Sistema de injecção e de aporte de solvente**

Introduz-se na coluna um determinado volume de solução de amostra, manualmente ou por intermédio de um amostrador automático, numa zona bem definida. No caso da introdução manual, a compressão do êmbolo ou a retirada da seringa demasiado rápidas poderão determinar alterações na distribuição de massas moleculares obtida. O sistema de aporte de solvente deve ser uniforme, recorrendo, se possível, a um amortecedor de pulsações. O caudal deve ser da ordem de 1 ml/min.

1.6.5. **Coluna**

Em função do tipo de amostra, os polímeros são analisados por recurso a uma única coluna ou a diversas colunas ligadas em série. Encontram-se disponíveis nos circuitos comerciais colunas de materiais porosos com propriedades (por exemplo, dimensões dos poros, limites de exclusão) bem definidas. A selecção do gel a utilizar, bem como do comprimento da coluna, depende das propriedades da amostra (volumes hidrodinâmicos, distribuição das massas moleculares) e das condições específicas de separação, nomeadamente o tipo de solvente utilizado, a temperatura e o caudal (l) (2) (3).

1.6.6. **Pratos teóricos**

Deve caracterizar-se a coluna ou sistema de colunas a utilizar na separação pelo respectivo número de pratos teóricos. No caso da utilização de THF como solvente de eluição, introduzir uma solução de etilbenzeno ou outro soluto apolar adequado numa coluna de comprimento conhecido. O número de pratos teóricos é dado pela equação:

$$N = 5{,}54 \left(\frac{V_e}{W_{1/2}} \right)^2 \qquad \text{ou} \qquad N = 16 \left(\frac{V_e}{W} \right)^2$$

em que:

N = representa o número de pratos teóricos,

V_e = representa o volume de eluição correspondente ao máximo do pico,

▼B

W = representa a largura da base do pico,

$W_{1/2}$ = representa a largura do pico a meia altura.

1.6.7. **Eficiência de separação**

Além do número de pratos teóricos, que determina a largura das bandas, a eficiência de separação, obtida a partir do declive da curva de calibração, desempenha também um papel importante. A eficiência de separação de uma coluna é dada por:

$$\frac{V_{e,M_x} - V_{e,(10M_x)}}{\text{secção transversal da coluna}} \geq 6{,}0 \left[\frac{cm^3}{cm^2}\right]$$

em que:

$V_{e,\ M_x}$ = representa o volume de eluição de uma fracção de poliestireno com massa molecular M_x e

$V_{e,(10M_{xx})}$ = representa o volume de eluição de uma fracção de poliestireno com massa molecular dez vezes superior.

A resolução do sistema é geralmente definida do seguinte modo:

$$R_{1,2} = 2 \times \frac{V_{e1} - V_{e2}}{W_1 + W_2} \times \frac{1}{\log_{10}(M_2/M_1)}$$

em que:

V_{e1}, V_{e2} = representam os volumes de eluição dos dois padrões de poliestireno, correspondentes ao máximo dos picos,

W_1, W_2 = representam a largura da base dos picos, e

M_1, M_2 = representam as massas moleculares correspondentes aos máximos dos picos, devendo diferir num factor de 10.

O valor R do sistema de colunas deve ser superior a 1,7 (4).

1.6.8. **Solventes**

Todos os solventes devem possuir um elevado grau de pureza (no caso do THF, o grau de pureza deve ser de 99,5 %). As dimensões do reservatório de solvente (que pode, se necessário, encontrar-se sob atmosfera inerte) devem ser suficientes para permitir a calibração da coluna e a realização de diversas análises. O solvente deve ser desgaseificado antes da sua introdução na coluna por intermédio da bomba.

1.6.9. **Controlo da temperatura**

A temperatura dos componentes críticos internos (septo de injecção, colunas, detector, tubagens) deve ser constante e adequada ao solvente escolhido.

▼B

1.6.10. **Detector**

A função do detector consiste no registo quantitativo da concentração da amostra eluída da coluna. De modo a evitar o alargamento dos picos, o volume da célula de detecção deve ser tão reduzido quanto possível, não devendo exceder 10 µl, excepto no caso dos detectores de difusão de radiações e de viscosidade. O método de detecção mais corrente consiste na refractometria diferencial. Todavia, se as propriedades específicas da amostra ou do solvente de eluição o justificarem, podem utilizar-se outros tipos de detectores, nomeadamente de radiação ultravioleta/visível, infravermelha e detectores de viscosidade.

2. **RESULTADOS E SUA APRESENTAÇÃO**

2.1. RESULTADOS

Para pormenores sobre os critérios de avaliação, bem como no que respeita às exigências em matéria de recolha e processamento de dados, deve consultar-se a norma DIN relevante (1).

Devem efectuar-se duas análises independentes e individuais de cada amostra.

Em cada análise, devem determinar-se os parâmetros M_n, M_w, M_w/M_n e M_p. Deve indicar-se explicitamente que os valores determinados constituem valores relativos equivalentes à massa molecular do padrão utilizado.

Após a determinação dos volumes de retenção ou tempos de retenção (eventualmente corrigidos por recurso a um padrão interno), representa-se graficamente o logaritmo de M_p (valor correspondente ao máximo do pico relativo ao padrão de calibração) em função de um dos parâmetros referidos. São necessários pelo menos dois pontos de calibração por década de massas moleculares e pelo menos cinco pontos para a curva total, que deve abranger a massa molecular estimada da amostra. A extremidade da curva de calibração correspondente às massas moleculares mais reduzidas é definida pelo n-hexilbenzeno ou outro solvente apolar adequado. As massas moleculares relativas ao número de moles e à massa das espécies são, em geral, obtidas por processamento electrónico dos dados, com base nas fórmulas que se apresentam no ponto 1.2. Caso se recorra ao tratamento manual dos mesmos, pode consultar-se a norma ASTM D 3536-91 (3).

Deve apresentar-se a distribuição na forma de quadro ou de gráfico (percentagem da soma ou do diferencial da frequência em função de log M). Na representação gráfica, uma década de massas moleculares deve corresponder a cerca de 4 cm, devendo a altura máxima dos picos ser de cerca de 8 cm. No caso de curvas de distribuição integral, a diferença entre 0 e 100 % deve corresponder a cerca de 10 cm.

2.2. RELATÓRIO

O relatório do ensaio deve incluir as seguintes informações:

2.2.1. **Substância em estudo**

— Dados disponíveis sobre a substância em estudo (identidade, aditivos, impurezas),

▼B

— descrição do tratamento da amostra, observações, problemas surgidos.

2.2.2. **Equipamento**

— Reservatório de eluente, gás inerte, desgaseificação do eluente, composição do eluente, impurezas,

— bomba, amortecedor de pulsações, sistema de injecção,

— colunas de separação (fabricante, todas as informações disponíveis sobre as características das colunas, nomeadamente dimensões dos poros, tipo de material utilizado, número, comprimento e ordem de utilização das colunas),

— número de pratos teóricos da coluna ou sistema de colunas; eficiência de separação (resolução do sistema),

— informações relativas à simetria dos picos,

— temperatura da coluna, tipo de controlo da temperatura utilizado,

— detector (princípio utilizado, tipo, volume da célula),

— medidor de caudal, se utilizado (fabricante, princípio utilizado),

— sistema de registo e processamento dos dados (equipamento e suporte lógico).

2.2.3. **Calibração do sistema**

— Descrição pormenorizada do método utilizado para obter a curva de calibração,

— informações relativas aos critérios de qualidade aplicáveis ao método (por exemplo, coeficiente de correlação, erro quadrático médio, etc.),

— informações relativas às extrapolações, hipóteses e aproximações efectuadas no decurso do processo experimental, bem como da avaliação e processamento dos dados,

— devem apresentar-se na forma de quadro os dados utilizados para a obtenção da curva de calibração, incluindo, para cada ponto de calibração, as seguintes informações:

  — nome da amostra,

  — fabricante da amostra,

  — valores de M_p, M_n, M_w, M_w/M_n característicos dos padrões, fornecidos pelo fabricante ou obtidos em determinações posteriores, bem como pormenores sobre o método de determinação utilizado,

  — volume de injecção e concentração da substância injectada,

▼B

— valor de M_p utilizado para a calibração,

— volume de eluição ou tempo de retenção corrigido correspondentes ao máximo dos picos,

— valores de M_p correspondentes ao máximo dos picos,

— percentagem de erro dos valores de M_p calculados e do valor de calibração.

2.2.4. **Avaliação**

— Avaliação com base no tempo: métodos utilizados para assegurar a reprodutibilidade requerida (método de correcção, padrão interno, etc.),

— informações que indiquem se a avaliação foi efectuada com base no volume de eluição ou no tempo de retenção,

— informações sobre os limites de avaliação, caso um pico não seja totalmente analisado,

— descrição dos eventuais métodos de nivelamento de dados utilizados,

— processos de preparação e tratamento prévio da amostra,

— eventual presença de partículas não dissolvidas,

— volume de injecção (expresso em µl) e concentração de injecção (expressa em mg/ml),

— observações que indiquem efeitos susceptíveis de induzir desvios relativamente às condições cromatográficas ideais,

— descrição pormenorizada das alterações aos procedimentos de ensaio,

— pormenores relativos às margens de erro,

— quaisquer outras informações e observações que possuam importância para a interpretação dos resultados.

3. **REFERÊNCIAS**

(1) DIN 55672 (1995). Gelpermeationschromatographie (GPC) mit Tetrahydrofuran (THF) als Elutionsmittel, Teil 1.

(2) Yau, W.W., Kirkland, J.J., and Bly, D.D. eds, (1979). Modern Size Exclusion Liquid Chromatography, J. Wiley and Sons.

(3) ASTM D 3536-91 (1991). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution by Liquid Exclusion Chromatography (Gel Permeation Chromatography-GPC). American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

(4) ASTM D 5296-92 (1992). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution of Polystyrene by High Performance Size-Exclusion Chromatography. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

▼B

Apêndice

Exemplos de outros métodos de determinação da massa molecular média em função do número de moles (M_n) em polímeros

A cromatografia de permeação em gel constitui o método mais indicado para a determinação de M_n, em especial sempre que se encontre disponível uma série de padrões com estrutura idêntica à do polímero a analisar. Todavia, nos casos em que o recurso àquela técnica apresente dificuldades práticas ou em que se preveja que a substância em causa não satisfaz um critério regulamentar em matéria de M_n, sendo necessário confirmar tal facto podem aplicar-se métodos alternativos, nomeadamente:

1. **Utilização das propriedades coligativas**

1.1. *Ebulioscopia/crioscopia*:

estas técnicas baseiam-se, respectivamente, na determinação do aumento do ponto de ebulição e do abaixamento do ponto de congelação de um solvente induzidos pela adição do polímero. O princípio do método consiste no facto de os efeitos do polímero dissolvido no ponto de ebulição ou de congelação do solvente dependerem da massa molecular do polímero (1) (2).

Aplicabilidade: $M_n < 20\,000$

1.2. *Abaixamento da pressão de vapor*:

esta técnica baseia-se na medição da pressão de vapor de um líquido de referência antes e após a adição de determinadas quantidades do polímero (1) (2).

Aplicabilidade: $M_n < 20\,000$ (em teoria; na prática, o valor é limitado).

1.3. Osmometria de membrana:

esta técnica baseia-se no princípio da osmose, isto é, da tendência natural das moléculas de solvente de passarem, através de uma membrana semipermeável, de uma solução diluída para uma solução concentrada, até atingir o equilíbrio. No ensaio em causa, a concentração da solução diluída é nula, enquanto que a solução concentrada contém o polímero. A passagem do solvente através da membrana determina uma diferença de pressão dependente da concentração e da massa molecular do polímero (1) (3) (4).

Aplicabilidade: valores de M_n compreendidos entre 20 000 e 200 000.

1.4. *Osmometria de fase de vapor*:

esta técnica baseia-se na comparação da velocidade de evaporação de um aerossol de solvente puro com a velocidade de evaporação de, no mínimo, três aerossóis que contêm o polímero em concentrações diversas (1) (5) (6).

Aplicabilidade: $M_n < 20\,000$

▼B

2. **Análise dos grupos terminais**

A utilização deste método implica o conhecimento simultâneo da estrutura global do polímero e da natureza dos grupos terminais, distinguíveis da cadeia principal por recurso a técnicas tais como a ressonância magnética nuclear, a titulação ou a formação de derivados. Com base na determinação da concentração molecular dos grupos terminais presentes no polímero, pode obter-se a respectiva massa molecular (7) (8) (9).

Aplicabilidade: M_n não superior a 50 000 (com fiabilidade decrescente).

3. **Referências**

(1) Billmeyer, F.W. Jr., (1984). Textbook of Polymeer Science, 3rd ed., John Wiley, New York.

(2) Glover, CA., (1975), Absolute Colligative Property Methods. Chapter 4 In: Polymer Molecular Weights, Part I, P.E., Slade, Jr. ed., Marcel Dekker, New York.

(3) ASTM D 3750-79, (1979). Standard Practice for Determination of Number-Average Molecular Weight of Polymers by Membrane Osmometry. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

(4) Coll, H. (1989), Membrane Osmometry. In: Determination of Molecular Weight, A.R. Cooper e., J. Wiley and Sons, p. 25-52.

(5) ASTM 3592-77, (1977). Standard Recommended Practice for Determination of Molecular Weight by Vapour Pressure, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

(6) Morris, C.E.M., (1989). Vapour Pressure Osmometry. In: Determination of Molecular Weight, A.R. Cooper ed., John Wiley and Sons.

(7) Schröder, E. Muller, G., and Arndt, K-F, (1989). Polymer Characterisation, Carl Hanser Verlag, Munich.

(8) Garmon, R.G., (1975). End-Group Determinations, Chapter 3. In: Polymer Molecular Weights, Part I, P.E. Slade, Jr. ed. Marcel Dekker, New York.

(9) Amiya, S., *et al.* (1990). Pure and Applied Chemistry, 62, 2139--2146.

▼B

A.19. TEOR EM POLÍMEROS DE BAIXA MASSA MOLECULAR

1. MÉTODO

O presente método, que utiliza a cromatografia de permeação em gel, é idêntico ao método OCDE TG 119 (1996). Os respectivos fundamentos e outras informações técnicas são apresentados nas referências.

1.1. INTRODUÇÃO

Tendo em conta a diversidade das propriedades dos biopolímeros, torna-se impossível descrever um único método que estabeleça de modo preciso as condições de separação e avaliação dos mesmos, abrangendo todas as possibilidades e especificidades. Muitos sistemas poliméricos complexos, nomeadamente, não são analisáveis por cromatografia de permeação em gel (GPC). Nos casos em que o recurso a esta técnica não se afigure viável, a massa molecular pode ser determinada através de outros métodos (ver apêndice), devendo documentar-se e justificar-se a opção utilizada.

O método descrito baseia-se na norma DIN 55672 (1); esta última contém informações pormenorizadas sobre o modo de execução do ensaio e a avaliação dos respectivos resultados. Caso seja necessário alterar determinadas condições do processo experimental, deve apresentar-se a devida justificação. Podem utilizar-se outras normas, na condição de apresentar as respectivas referências. O método descrito utiliza, para fins de calibração, amostras de poliestireno de polidispersibilidade conhecida, podendo ser necessário efectuar alterações de modo a torná-lo adequado a determinados polímeros, nomeadamente polímeros hidrossolúveis e polímeros reticulados de cadeia longa.

1.2. DEFINIÇÕES E UNIDADES

Por convenção, considera-se baixa uma massa molecular inferior a 1 000 dalton.

A massa molecular média em função do número de moles, M_n, e a massa molecular média relativa à massa das espécies, M_w, são determinadas por recurso às equações:

$$M_n = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i / M_i} \qquad M_w = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i \times M_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i}$$

em que:

H_i = é a intensidade do sinal do detector correspondente ao volume de retenção V_j, contado a partir da linha de base,

M_i = é a massa molecular da fracção do polímero correspondente ao volume de retenção V_i, e n é o número de pontos obtidos experimentalmente.

A amplitude da distribuição de massas moleculares, que constitui uma medida da dispersibilidade do sistema, é dada pelo quociente M_w/M_n.

▼B

1.3. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

Uma vez que a cromatografia de permeação em gel constitui um método relativo deve efectuar-se uma calibração. Para tal, podem utilizar-se padrões de poliestireno de cadeia linear, com uma distribuição limitada, e massas moleculares médias (M_n e M_w) e distribuição de massas moleculares conhecidas. A curva de calibração apenas pode ser utilizada na determinação da massa molecular da amostra desconhecida caso as condições de separação da referida amostra e dos padrões tenham sido seleccionadas de modo idêntico.

Uma determinada relação entre a massa molecular e o volume de eluição apenas é válida nas condições específicas de cada ensaio. Estas últimas incluem, nomeadamente, a temperatura, o tipo de solvente (ou mistura de solventes), as condições cromatográficas e a coluna ou sistema de colunas de separação.

As massas moleculares da amostra determinadas pelo método em causa constituem valores relativos, sendo designadas «massas moleculares em equivalentes de poliestireno». Tal facto significa que as massas moleculares podem apresentar desvios relativamente aos valores absolutos em função das diferenças estruturais e químicas entre a amostra e os padrões. Caso se utilizem outros padrões, nomeadamente polietilenoglicol, óxido de polietileno, metracrilato de polimetilo ou ácido poliacrílico, devem justificar-se os motivos.

1.4. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

A determinação da distribuição das massas moleculares, bem como das massas moleculares médias da amostra (M_n M_w), pode fazer-se por recurso à cromatografia de permeação em gel, que consiste numa variante da cromatografia líquida em que a amostra é separada em função dos volumes hidrodinâmicos dos diversos componentes (2).

A separação é efectuada por passagem através de uma coluna cujo enchimento consiste num material poroso, de modo geral um gel orgânico. As moléculas de dimensões mais reduzidas passam através dos poros, sendo as restantes excluídas. A fixação das moléculas de maiores dimensões é, pois, menor, sendo eluídas em primeiro lugar. As moléculas de dimensões médias passam através de alguns poros, sendo eluídas numa fase posterior. Finalmente, as moléculas de dimensões mais reduzidas, que possuem um raio hidrodinâmico inferior ao dos poros do gel, penetram estes últimos, sendo eluídas em último lugar.

Em condições ideais, a separação é determinada apenas pelas dimensões das moléculas, embora, na prática, seja difícil evitar algumas interferências devidas à absorção. A não uniformidade do enchimento e a existência de volumes mortos poderão induzir problemas complementares (2).

A detecção pode ser efectuada com base no índice de refracção ou por absorção no ultravioleta, originando uma curva de distribuição simples. Todavia, de modo a atribuir valores de massa molecular aos vários pontos da curva, é necessário efectuar uma calibração por recurso a polímeros de massa molecular conhecida e, se possível, de estrutura similar, nomeadamente padrões de poliestireno. A curva resultante da representação gráfica da quantidade, expressa em massa, das diversas espécies eluídas em função do logaritmo da massa molecular deve exibir uma distribuição de Gauss, por vezes distorcida por uma ligeira assimetria na região das massas moleculares mais reduzidas.

▼B

O teor de espécies de baixa massa molecular é determinado a partir da curva. O respectivo cálculo preciso depende da reprodução do comportamento do polímero por parte das referidas espécies, por unidade de massa.

1.5. CRITÉRIOS DE QUALIDADE

A repetibilidade (desvio-padrão relativo) do volume de eluição deve ser superior a 0,3 %. Se um cromatograma elaborado em função do tempo não corresponder aos critérios *supra* deve assegurar-se a necessária repetibilidade da análise mediante correcção por recurso a um padrão interno (1). As polidispersões dependem da massa molecular de cada padrão. No caso da utilização de padrões de poliestireno, os valores característicos são os seguintes:

$M_p < 2\,000$	$M_w/M_n < 1{,}20$
$2\,000 \leq M_p \leq 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}05$
$M_p > 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}20$

(M_p representa a massa molecular do padrão correspondente ao máximo do pico).

1.6. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.6.1. **Preparação das soluções-padrão de poliestireno**

Os padrões de poliestireno são dissolvidos, com agitação, no eluente escolhido, tendo em conta as recomendações do fabricante.

As concentrações dos padrões dependem de vários factores, nomeadamente o volume de injecção, a viscosidade da solução e a sensibilidade do detector. Deve adaptar-se o volume de injecção máximo ao comprimento da coluna, de modo a evitar uma sobrecarga. Os volumes de injecção característicos de separações analíticas por cromatografia de permeação em gel com uma coluna de 30 cm × 7,8 mm situam-se, de modo geral, entre 40 e 100 µl. É possível injectar volumes superiores, que não devem, contudo, exceder 250 µl. Antes de calibrar a coluna, deve determinar-se o rácio adequado volume de injecção/concentração.

1.6.2. **Preparação da solução de amostra**

De modo geral, as condições atrás referidas são também aplicáveis à preparação das soluções de amostra. Esta última é dissolvida num solvente adequado, nomeadamente tetra-hidrofurano (THF), sob agitação cuidadosa. Em caso algum deverá utilizar-se um banho de ultra-sons. Se necessário, a solução de amostra pode ser purificada por passagem através de um filtro de membrana, cujos poros deverão ter dimensões compreendidas entre 0,2 e 2 µm.

Deve referir-se no relatório final a eventual presença de partículas não dissolvidas, que poderão conter espécies de massa molecular superior. Deve utilizar-se um método adequado para determinar a percentagem ponderal das partículas em causa. As soluções devem ser utilizadas nas 24 horas subsequentes à sua preparação.

▼B

1.6.3. **Correcções determinadas pela presença de impurezas e aditivos**

No que respeita ao teor de espécies com M < 1 000, torna-se geralmente necessário introduzir uma correcção destinada a ter em conta a presença de componentes específicos não poliméricos (nomeadamente impurezas e aditivos), excepto no caso de o teor determinado ser inferior a 1 %. A referida correcção pode ser efectuada por análise directa da solução de polímero ou da solução obtida após a eluição cromatográfica.

Se a solução obtida por eluição cromatográfica for demasiado diluída para permitir a análise, deverá ser concentrada, podendo ser necessário evaporá-la à secura, redissolvendo o resíduo. A concentração deve ser efectuada em condições que assegurem a não concorrência de alterações na solução eluída. O tratamento desta depende do método analítico utilizado para a análise quantitativa.

1.6.4. **Equipamento**

O equipamento de cromatografia de permeação em gel inclui os seguintes componentes:

— reservatório de solvente,

— desgaseificador (se adequado),

— bomba,

— amortecedor de pulsações (se adequado),

— sistema de injecção,

— colunas cromatográficas,

— detector,

— medidor de caudal (se adequado),

— sistema de registo e processamento de dados,

— recipiente para resíduos.

Deve assegurar-se o carácter inerte do sistema cromatográfico em relação aos solventes utilizados (nomeadamente no caso da utilização de capilares de aço com THF).

1.6.5. **Sistema de injecção e de aporte de solvente**

Introduz-se na coluna um determinado volume de solução de amostra, manualmente ou por intermédio de um amostrador automático, numa zona bem definida. No caso da introdução manual, a compressão do êmbolo ou a retirada da seringa demasiado rápidas poderão determinar alterações na distribuição de massas moleculares obtida. O sistema de aporte de solvente deve ser uniforme, recorrendo, se possível, a um amortecedor de pulsações. O caudal deve ser da ordem de 1 ml/min.

1.6.6. **Coluna**

Em função do tipo de amostra, os polímeros são analisados por recurso a uma única coluna ou a diversas colunas ligadas em série. Encontram-se disponíveis nos circuitos comerciais colunas de materiais porosos com propriedades (por exemplo, dimensões dos poros, limites de exclusão) bem definidas. A selecção do gel a utilizar, bem como do comprimento da coluna, depende das propriedades da amostra (volumes hidrodinâmicos, distribuição das massas moleculares) e das condições específicas de separação, nomeadamente o tipo de solvente utilizado, a temperatura e o caudal (1) (2) (3).

▼B

1.6.7. **Pratos teóricos**

Deve caracterizar-se a coluna ou sistema de colunas a utilizar na separação pelo respectivo número de pratos teóricos. No caso da utilização de THF como solvente de eluição, introduzir uma solução de etilbenzeno ou outro soluto apolar adequado numa coluna de comprimento conhecido. O número de pratos teóricos é dado pela equação:

$$N = 5{,}54\left(\frac{V_e}{W_{1/2}}\right)^2 \qquad \text{ou} \qquad N = 16\left(\frac{V_e}{W}\right)^2$$

em que:

N = representa o número de pratos teóricos,

V_e = representa o volume de eluição correspondente ao máximo do pico,

W = representa a largura da base do pico,

$W_{1/2}$ = representa a largura do pico a meia altura.

1.6.8. **Eficiência de separação**

Além do número de pratos teóricos, que determina a largura das bandas, a eficiência de separação, obtida a partir do declive da curva de calibração, desempenha também um papel importante. A eficiência de separação de uma coluna é dada por:

$$\frac{V_{e,M_x} - V_{e,(10M_x)}}{\text{secção transversal da coluna}} \geq 6{,}0\left[\frac{cm^3}{cm^2}\right]$$

em que

$V_{e,\ M_x}$ = representa o volume de eluição de uma fracção de poliestireno com massa molecular M_x e

$V_{e,(10M_x)}$ = representa o volume de eluição de uma fracção de poliestireno com massa molecular dez vezes superior.

A resolução do sistema é geralmente definida do seguinte modo:

$$R_{1,2} = 2 \times \frac{V_{e1} - V_{e2}}{W_1 + W_2} \times \frac{1}{\log_{10}(M_2/M_1)}$$

em que

V_{e1}, V_{e2} = representam os volumes de eluição dos dois padrões de poliestireno, correspondentes ao máximo dos picos,

W_1, W_2 = representam a largura da base dos picos, e

M_1, M_2 = representam as massas moleculares correspondentes aos máximos dos picos, devendo diferir num factor de 10.

O valor R do sistema de colunas deve ser superior a 1,7 (4).

▼B

1.6.9. **Solventes**

Todos os solventes devem possuir um elevado grau de pureza (no caso do THF, o grau de pureza deve ser de 99,5 %). As dimensões do reservatório de solvente (que pode, se necessário, encontrar-se sob atmosfera inerte) devem ser suficientes para permitir a calibração da coluna e a realização de diversas análises. O solvente deve ser desgaseificado antes da sua introdução na coluna por intermédio da bomba.

1.6.10. **Controlo da temperatura**

A temperatura dos componentes críticos internos (septo de injecção, colunas, detector e tubagens) deve ser constante e adequada ao solvente escolhido.

1.6.11. **Detector**

A função do detector consiste no registo quantitativo da concentração da amostra eluída da coluna. De modo a evitar o alargamento dos picos, o volume da célula de detecção deve ser tão reduzido quanto possível, não devendo exceder 10 µl, excepto no caso dos detectores de difusão de radiações e de viscosidade. O método de detecção mais corrente consiste na refractometria diferencial. Todavia, se as propriedades específicas da amostra ou do solvente de eluição o justificarem, podem utilizar-se outros tipos de detectores, nomeadamente de radiação ultravioleta/visível, infravermelha e detectores de viscosidade.

2. **RESULTADOS E SUA APRESENTAÇÃO**

2.1. RESULTADOS

Para pormenores sobre os critérios de avaliação, bem como no que respeita às exigências em matéria de recolha e processamento de dados, deve consultar-se a norma DIN relevante (1).

Devem efectuar-se duas análises independentes e individuais de cada amostra. Em todos os casos, devem efectuar-se também ensaios em branco, em condições idênticas.

Deve indicar-se explicitamente que os valores determinados constituem valores relativos expressos em equivalentes da massa molecular do padrão utilizado.

Após a determinação dos volumes de retenção ou tempos de retenção (eventualmente corrigidos por recurso a um padrão interno), representa-se graficamente o logaritmo de M_p (valor correspondente ao máximo do pico relativo ao padrão de calibração) em função de um dos parâmetros referidos. São necessários pelo menos dois pontos de calibração por década de massas moleculares e pelo menos cinco pontos para a curva total, que deve abranger a massa molecular estimada da amostra. A extremidade da curva de calibração correspondente às massas moleculares mais reduzidas é definida pelo n-hexilbenzeno ou outro solvente apoiar adequado. A parte da curva correspondente a massas moleculares inferiores a 1 000 determina-se e se necessário corrige-se para aditivos e impurezas. Caso se recorra ao tratamento manual dos mesmos, pode consultar-se a norma ASTM D 3536-91 (3).

▼B

Caso fique retido na coluna um polímero insolúvel, é provável que a sua massa molecular seja superior à massa molecular da fracção solúvel, pelo que a não tomada em conta do mesmo no cálculo do teor de espécies de baixa massa molecular determinará uma sobrestimativa deste último. Apresentam-se em apêndice directrizes para a correcção do teor de espécies de baixa massa molecular de polímeros insolúveis.

Deve apresentar-se a distribuição na forma de quadro ou de gráfico (percentagem da soma ou do diferencial da frequência em função de log M). Na representação gráfica, uma década de massas moleculares deve corresponder a cerca de 4 cm, devendo a altura máxima dos picos ser de cerca de 8 cm. No caso de curvas de distribuição integral, a diferença entre 0 e 100 % deve corresponder a cerca de 10 cm.

2.2. RELATÓRIO

O relatório do ensaio deve incluir as seguintes informações:

2.2.1. **Substância em estudo**

— Dados disponíveis sobre a substância em estudo (identidade, aditivos, impurezas),

— descrição do tratamento da amostra, observações, problemas.

2.2.2. **Equipamento**

— Reservatório de eluente, gás inerte, desgaseificação do eluente, composição do eluente, impurezas,

— bomba, amortecedor de pulsações, sistema de injecção,

— colunas de separação (fabricante, todas as informações disponíveis sobre as características das colunas, nomeadamente dimensões dos poros, tipo de material utilizado, número, comprimento e ordem de utilização das colunas),

— número de pratos teóricos da coluna ou sistema de colunas; eficiência de separação (resolução do sistema),

— informações relativas à simetria dos picos,

— temperatura da coluna, tipo de controlo da temperatura utilizado,

— detector (princípio utilizado, tipo, volume da célula),

— medidor de caudal, se utilizado (fabricante, princípio utilizado),

— sistema de registo e processamento dos dados (equipamento e suporte lógico).

2.2.3. **Calibração do sistema**

— Descrição pormenorizada do método utilizado para obter a curva de calibração,

▼B

— informações relativas aos critérios de qualidade aplicáveis ao método (por exemplo, coeficiente de correlação, erro quadrático médio, etc.),

— informações relativas às extrapolações, hipóteses e aproximações efectuadas no decurso do processo experimental, bem como da avaliação e processamento dos dados,

— devem apresentar-se na forma de quadro os dados utilizados para a obtenção da curva de calibração, incluindo, para cada ponto de calibração, as seguintes informações:

  — nome da amostra,

  — fabricante da amostra,

  — valores de M_p, M_n, M_w, M_w/M_n característicos dos padrões, fornecidos pelo fabricante ou obtidos em determinações posteriores, bem como pormenores sobre o método de determinação utilizado,

  — volume de injecção e concentração da substância injectada,

  — valor de M_p utilizado para a calibração,

  — volume de eluição ou tempo de retenção corrigido correspondentes ao máximo dos picos,

  — valores de M_p correspondentes ao máximo dos picos,

  — percentagem de erro dos valores de M_p calculados e do valor de calibração.

2.2.4. **Informações sobre o teor em polímeros de baixa massa molecular**

— Descrição dos métodos de análise e dos procedimentos utilizados,

— informações relativas ao teor de espécies e baixa massa molecular da amostra, expresso em percentagem ponderal,

— informações relativas ao teor de impurezas, aditivos e de outras espécies não poliméricas da amostra, expresso em percentagem ponderal.

2.2.5. **Avaliação**

— Avaliação com base no tempo: métodos utilizados para assegurar a reprodutibilidade requerida (método de correcção, padrão interno, etc.),

— informações que indiquem se a avaliação foi efectuada com base no volume de eluição ou no tempo de retenção,

— informações sobre os limites de avaliação, caso um pico não seja totalmente analisado,

— descrição dos eventuais métodos de nivelamento de dados utilizados,

— processos de preparação e tratamento prévio da amostra,

— eventual presença de partículas não dissolvidas,

▼B

— volume de injecção (expresso em µl) e concentração de injecção (expressa em mg/ml),

— observações que indiquem efeitos susceptíveis de induzir desvios relativamente às condições cromatográficas ideais,

— descrição pormenorizada das alterações aos procedimentos de ensaio,

— pormenores relativos às margens de erro,

— quaisquer outras informações e observações que possuam importância para a interpretação dos resultados.

3. **REFERÊNCIAS**

(1) DIN 55672 (1995). Geldpermeationschromatographie (GPC) mit Tetrahydrofuran (THF) als Elutionsmittel, Teil 1.

(2) Yau, W.W., Kirkland, J.J., and Bly, D.D. eds, (1979). Modern Size Exclusion Liquid Chromatography, J.Wiley and Sons.

(3) ASTM D 3536-91 (1991). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution by L iquid Exclusion Chromatography (Gel Permeation Chromatography-GPC). American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

(4) ASTM D 5296-92 (1992). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution of Polystyrene by High Performance Size-Exclusion Chromatography. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

▼B

Apêndice

Directrizes para a correcção do teor de espécies de baixa massa molecular determinada pela presença de polímeros insolúveis

A presença de polímeros insolúveis na amostra determina perdas de massa no decurso da análise por cromatografia de permeação em gel. Os polímeros insolúveis são retidos de forma irreversível na coluna ou filtro, enquanto que a porção solúvel da amostra prossegue o seu percurso. Se for possível estimar ou determinar o incremento do índice de refracção do polímero (dn/dc), pode calcular-se a perda de massa na coluna. Neste caso, efectua-se uma correcção por recurso a calibração externa do refractómetro com substâncias-padrão de concentração e dn/dc conhecidos. No exemplo que se segue, utiliza-se um padrão de poli(metacrilato de metilo) (pMMA).

No caso dos polímeros acrílicos, a calibração externa consiste na análise por cromatografia de permeação em gel de uma solução de um padrão de pMMA em tetra-hidrofurano, de concentração conhecida; os dados resultantes são utilizados para calcular a constante do refractómetro, por recurso à fórmula:

$$K = R/(C \times V \times dn/dc)$$

em que:

K = representa a constante do refractómetro, expressa em mV.s/ml,

R = representa a resposta do padrão de pMMA, expressa em mV.s,

C = representa a concentração do padrão de pMMA, expressa em mg/ml,

V = representa o volume de injecção, expresso em ml,

dn/dc = representa o incremento do índice de refracção relativo à solução de pMMA em tetra-hidrofurano, expresso em ml/mg.

Os valores *infra* são característicos de um padrão de pMMA:

R = 2 937 891

C = 1,07 mg/ml

V = 0,1 ml

dn/dc = 9×10^{-5} ml/mg

O valor de K resultante ($3{,}05 \times 10^{11}$) é utilizado para o cálculo da resposta teórica do detector no caso da eluição e detecção da totalidade do polímero injectado.

▼B

A.20. COMPORTAMENTO DOS POLÍMEROS DA DISSOLUÇÃO/ EXTRACÇÃO AQUOSA

1. MÉTODO

O presente método é idêntico à versão revista do método OCDE TG 120 (1997). As informações técnicas específicas são apresentadas na referência (1).

1.1. INTRODUÇÃO

No caso de determinados polímeros, nomeadamente polímeros de emulsão, pode ser necessário efectuar trabalhos preliminares antes da aplicação do método descrito *infra*. O método não é aplicável a polímeros líquidos e polímeros que reajam com a água nas condições de ensaio.

Nos casos em que a aplicação do método não se afigure viável, pode investigar-se o comportamento dos polímeros na dissolução/extracção aquosa por recurso a outros métodos, devendo apresentar-se a justificação de tal facto, bem como a descrição pormenorizada dos métodos em causa.

1.2. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

Não aplicável.

1.3. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

O comportamento dos polímeros na dissolução/extracção aquosa é determinado através do método do recipiente de vidro (ver A.6 — Solubilidade em água — método do recipiente de vidro) alterado do modo que se descreve de seguida.

1.4. CRITÉRIOS DE QUALIDADE

Não aplicável.

1.5. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.5.1. **Equipamento**

O equipamento necessário à aplicação do método é o seguinte:

— dispositivo de trituração (por exemplo, triturador que produza partículas de dimensões conhecidas),

— dispositivo de agitação com possibilidade de controlo da temperatura,

— sistema de filtros de membrana,

— equipamento analítico adequado,

— crivos normalizados.

1.5.2. **Preparação da amostra**

Por recurso a crivos adequados, reduz-se uma amostra representativa a uma granulometria compreendida entre 0,125 e 0,25 mm. De modo a assegurar a estabilidade da amostra ou do processo de trituração, pode ser necessário utilizar um sistema de refrigeração. Os materiais com consistência idêntica à da borracha podem ser triturados à temperatura do azoto líquido (1).

Caso não se obtenham partículas com a granulometria desejada, deve procurar reduzir-se tanto quanto possível as dimensões das mesmas, referindo tal facto no relatório. Este último deve também indicar o modo de armazenagem da amostra triturada, antes da sua utilização no ensaio.

▼B

1.5.3. **Procedimento**

Pesam-se três porções de 10 g da substância em estudo, que se colocam em três recipientes munidos de rolhas de vidro, a cada um dos quais se adicionam 1 000 ml de água. Caso a utilização de 10 g de amostra se revele impraticável, deve utilizar-se a quantidade máxima possível, ajustando o volume de água proporcionalmente à mesma.

Os recipientes são hermeticamente fechados e agitados a 20 °C. Deve utilizar-se um dispositivo de agitação ou dissolução que funcione a temperatura constante. Após 24 horas, centrifuga-se ou filtra-se o conteúdo de cada recipiente, determinando-se a concentração do polímero na fase aquosa límpida por recurso a um método analítico adequado. Caso não se encontrem disponíveis métodos analíticos adequados aplicáveis à fase aquosa, pode estimar-se a solubilidade ou extractividade totais com base na massa a seco do resíduo de filtração ou do precipitado obtido por centrifugação.

Em geral, é necessário efectuar uma distinção quantitativa entre as impurezas e os aditivos, por um lado, e as espécies de baixa massa molecular, por outro. No caso da determinação gravimétrica, deve também efectuar-se um ensaio em branco, de modo a avaliar a contribuição de eventuais resíduos decorrentes do processo experimental.

O comportamento dos polímeros na dissolução/extracção aquosa a 37 °C, a pH 2 e pH 9 determina-se como descrito para a experiência a 20 °C. O pH das soluções é corrigido através da adição quer de tampões quer de ácidos ou bases adequados, nomeadamente ácido clorídrico, ácido acético, hodróxido de sódio ou de potássio de qualidade analítica e amónia.

Em função do método analítico utilizado, devem efectuar-se um ou dois ensaios. Sempre que seja possível utilizar métodos suficientemente específicos que permitam a determinação directa do componente polimérico na fase aquosa, pode efectuar-se um único ensaio, tal como descrito *supra.* Todavia, caso tal não seja possível e seja necessário determinar o comportamento dos polímeros na dissolução/
extracção aquosa do polímero por um processo indirecto, nomeadamente através da determinação do teor de carbono orgânico total do extracto aquoso, deve efectuar-se um ensaio complementar em triplicado, utilizando amostras de polímeros dez vezes inferiores e volumes de água idênticos aos utilizados no primeiro ensaio.

1.5.4. **Análise**

1.5.4.1. *Ensaio efectuado com uma única granulometria*

Alguns métodos permitem a análise directa dos componentes poliméricos na fase aquosa. Todavia, como alternativa, pode proceder-se à análise indirecta dos componentes poliméricos dissolvidos/extraídos mediante a determinação do teor total de componentes solúveis, aplicando uma correcção destinada a ter em conta a presença de componentes específicos não poliméricos.

A determinação das espécies poliméricas totais na fase aquosa pode ser efectuada por recurso a um método suficientemente sensível, como por exemplo:

— determinação do carbono orgânico total mediante digestão com persulfato ou dicromato, de modo a obter CO_2, que é seguidamente doseado por espectroscopia de infravermelhos ou análise química,

▼B

— espectrometria de absorção atómica ou, no caso de polímeros que contenham silício ou metais, de plasma indutivo,

— espectroscopia de absorção ou espectrofluorimetria no ultravioleta, no caso de polímeros arílicos,

— cromatografia em fase líquida acoplada com espectrometria de massa, no caso de amostras de baixa massa molecular.

A referida determinação pode também ser efectuada por evaporação à secura, sob vácuo, do extracto aquoso, seguida de análise do resíduo por espectroscopia de infravermelhos, ultravioleta, etc., ou espectrometria de absorção atómica de plasma indutivo.

Caso a análise da fase aquosa não seja viável, esta última deve ser extraída com um solvente orgânico não miscível em água, nomeadamente um hidrocarboneto clorado. Procede-se em seguida à evaporação do solvente e determinação do teor de polímero de acordo com o método descrito *supra.* Na determinação do grau de dissolução/extracção do polímero devem subtrair-se quaisquer componentes do resíduo identificados como impurezas ou aditivos.

Caso se encontrem presentes quantidades relativamente elevadas das referidas matérias, pode ser necessário analisar o resíduo por HPLC ou cromatografia em fase gasosa, com o objectivo de distinguir as impurezas do monómero e das espécies presentes derivadas do mesmo, de modo a determinar o respectivo teor.

Em alguns casos, poderá bastar a evaporação do solvente orgânico à secura e subsequente pesagem do resíduo seco.

1.5.4.2. *Ensaio efectuado com duas granulometrias*

Determina-se o teor de carbono orgânico total dos extractos aquosos.

Efectua-se uma determinação gravimétrica com a porção não dissolvida e não extraída da amostra. Se, após a centrifugação ou filtragem do conteúdo de um determinado recipiente, permanecerem resíduos poliméricos nas respectivas paredes, deve lavar-se o mesmo com o filtrado até que não se observem quaisquer resíduos, procedendo então a uma nova centrifugação e filtragem. Os resíduos que permaneçam no filtro ou no tubo de centrifugação são secos a 40 ^{o}C, sob vácuo, e pesados.

2. **RESULTADOS**

2.1. ENSAIO EFECTUADO COM UMA ÚNICA GRANULOMETRIA

Devem apresentar-se os resultados relativos a cada recipiente, bem como os valores médios, expressos em unidades de massa por volume de solução (de modo geral, mg/l) ou de massa por massa de amostra de polímero (de modo geral, mg/g). Deve também fornecer-se a perda de massa da amostra, expressa no quociente entre a massa de soluto e a massa inicial da amostra, bem como os desvios-padrão relativos. Devem apresentar-se dados relativos à totalidade da substância (polímero + aditivos essenciais, etc.) e apenas ao polímero (após subtracção do teor de aditivos).

▼B

2.2. ENSAIO EFECTUADO COM DUAS GRANULOMETRIAS

Os teores de carbono orgânico total dos diversos extractos aquosos (ensaios em triplicado), bem como o valor médio relativo a cada ensaio, devem ser expressos em unidades de massa por volume de solução (de modo geral, mgC/l) ou de massa por massa de amostra de polímero (de modo geral, mgC/g).

O facto de não se observarem diferenças entre os resultados relativos aos rácios superior e inferior amostra/água poderá indicar a extracção efectiva de todos os componentes extractáveis. Neste caso, não é geralmente necessário proceder à análise directa.

Devem apresentar-se as massas dos diversos resíduos, expressas em percentagem das massas iniciais das amostras, calculando as médias relativas a cada ensaio. A diferença entre 100 % e as percentagens obtidas representa as percentagens de matérias solúveis e extractáveis nas amostras originais.

3. **RELATÓRIO**

3.1. RELATÓRIO DO ENSAIO

O relatório do ensaio deve incluir as seguintes informações:

3.1.1. **Substância em estudo**

— Informações disponíveis sobre a substância em estudo (identidade, aditivos, impurezas, teor de espécies de baixa massa molecular).

3.1.2. **Condições experimentais**

— Descrição dos procedimentos utilizados e das condições experimentais,

— descrição dos métodos analíticos e de detecção utilizados.

3.1.3. **Resultados**

— Solubilidade ou extractividade, expressas em mg/ml; valores individuais e médios obtidos nos ensaios de extracção das diversas soluções, discriminando o teor de polímero e de impurezas, aditivos, etc.,

— solubilidade ou extractividade do polímero, expressas em mg/ml,

— teor de carbono orgânico total dos extractos aquosos, massa do soluto e percentagens calculadas, se for caso disso,

— pH de cada amostra,

— resultados dos ensaios em branco,

— sempre que necessário, referências à instabilidade química da substância em estudo no decurso dos processos de ensaio e analítico,

— quaisquer informações que possuam importância para a interpretação dos resultados.

4. **REFERÊNCIAS**

(1) DIN 53733 (1976). Zerkleinerung von Kunststofferzeugnissen für Prüfzwecke.

▼B

A.21. PROPRIEDADES DE COMBURÊNCIA (LÍQUIDOS)

1. MÉTODO

1.1. INTRODUÇÃO

O presente método de ensaio destina-se à determinação do potencial de uma substância líquida de aumentar a velocidade ou intensidade de combustão de uma substância combustível, ou de formar misturas homogéneas com uma substância combustível que possam sofrer ignição espontânea. O método baseia-se no ensaio da ONU para líquidos comburentes (1l), ao qual é equivalente. Todavia, uma vez que o método A.21 se destina essencialmente a satisfazer as exigências da Directiva 67/548/CEE, apenas é necessária a comparação com uma substância de referência. Caso se preveja que os resultados do ensaio sejam utilizados para outros fins, pode ser necessário efectuar ensaios complementares e comparações com outras substâncias de referência ([1]).

Não é necessário realizar o ensaio se uma análise simples da fórmula estrutural da substância permitir estabelecer com um grau de confiança elevado que a mesma não reage exotermicamente com matérias combustíveis.

Antes de realizar o ensaio, é conveniente obter informações sobre eventuais propriedades explosivas da substância.

O método não é aplicável a sólidos, gases e outras substâncias explosivas ou altamente inflamáveis, nem a peróxidos orgânicos.

Não é necessário realizar o ensaio se existirem dados referentes à substância em estudo obtidos por aplicação do ensaio da ONU para líquidos comburentes (1).

1.2. DEFINIÇÕES E UNIDADES

O tempo médio necessário para o aumento da pressão é a média dos tempos determinados necessários para que a pressão da mistura em estudo aumente de 690 kPa para 2 070 kPa acima da pressão atmosférica.

1.3. SUBSTÂNCIA DE REFERÊNCIA

Utiliza-se como substância de referência uma solução aquosa a 65 %, em massa, de ácido nítrico de qualidade analítica ([2]).

([1]) Por exemplo, o ensaio no âmbito da regulamentação da ONU relativa ao transporte de mercadorias perigosas.

([2]) O ácido deve ser titulado antes do ensaio, de modo a confirmar a sua concentração.

▼B

Caso o experimentador preveja que os resultados do ensaio sejam utilizados para outros fins ([1]), pode revelar-se adequado efectuar ensaios com outras substâncias de referência ([2]).

1.4. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

O líquido em estudo é misturado, na proporção 1:1, em massa, com fibras de celulose, e introduzido num recipiente pressurizado. Se, durante o processo de mistura ou enchimento, ocorrer ignição espontânea, não é necessário prosseguir o ensaio.

Caso não ocorra ignição espontânea, realiza-se o ensaio na sua totalidade. A mistura é aquecida no recipiente pressurizado, determinando-se o tempo médio necessário para que a pressão aumente de 690 kPa para 2 070 kPa acima da pressão atmosférica. Este tempo é comparado com o tempo médio necessário para o aumento da pressão da mistura na proporção de 1:1 da(s) substância(s) de referência com celulose.

1.5. CRITÉRIOS DE QUALIDADE

Os resultados de uma série de cinco ensaios com uma determinada substância não devem diferir em mais de 30 % da média aritmética. Devem desprezar-se os resultados que mostrem uma divergência superior a 30 % relativamente à média, alterando-se os procedimentos de mistura e enchimento, após o que deve repetir-se o ensaio.

1.6. DESCRIÇÃO DO MÉTODO

1.6.1. **Preparação**

1.6.1.1. *Substância combustível*

Utilizam-se como matéria combustível fibras de celulose secas, de comprimento compreendido entre 50 e 250 μm e diâmetro médio 25 μm ([3]). As fibras são secas a massa constante, numa placa de espessura não superior a 25 mm, a 105 °C, durante 4 horas, e mantidas num exsicador com exsicante, até ao arrefecimento e utilização. O teor de humidade da celulose seca deve ser inferior a 0,5 % em relação à massa seca ([4]). Para tal, se necessário, deve prolongar-se o tempo de secagem ([5]). Deve utilizar-se o mesmo lote de celulose em todo o ensaio.

([1]) Por exemplo, o ensaio no âmbito da regulamentação da ONU relativa ao transporte de mercadorias perigosas.

([2]) Na referência 1, por exemplo, utilizam-se ácido perclórico a 50 %, em massa, e clorato de sódio a 40 %, em massa.

([3]) Por exemplo, celulose Whatman para cromatografia em coluna, referência CF 11, n.º de catálogo 4021 050.

([4]) Confirmado, por exemplo, através de uma titulação de Karl Fisher.

([5]) Como alternativa, pode obter-se o teor de humidade em causa por aquecimento a 105 °C, sob vácuo, durante 24 h.

▼B

1.6.1.2. *Equipamento*

1.6.1.2.1.
Dispositivo pressurizado

Deve utilizar-se um dispositivo constituído por um recipiente pressurizado de aço de forma cilíndrica, com 89 mm de comprimento e 60 mm de diâmetro externo (ver figura 1). São maquinadas duas superfícies planas em lados opostos, reduzindo a secção local do recipiente para 50 mm, de modo a facilitar a imobilização durante a colocação dos obturadores de ignição e de ventilação. O recipiente, com um diâmetro interno de 20 mm, é rebaixado internamente em ambas as extremidades até uma profundidade de 19 mm e roscado para tubos normalizados BSP (*British Standard Pipe*) de 1", ou o seu equivalente no sistema métrico. É enroscada à superfície curva do recipiente pressurizado uma tomada de pressão, a 35 mm de uma das extremidades, perpendicularmente às superfícies planas maquinadas. O encaixe, roscado para receber a rosca da tomada de pressão (tubo normalizado BSP de 1/2", ou o seu equivalente no sistema métrico), é realizado a uma profundidade de 12 mm. Se necessário, é instalada uma junta de material inerte, de modo a assegurar estanquidade aos gases. A tomada de pressão tem um comprimento exterior de 55 mm relativamente ao corpo do dispositivo e um furo axial com 6 mm de diâmetro. A extremidade da tomada de pressão é rebaixada e roscada de forma a receber um transdutor de pressão com diafragma. Pode utilizar-se qualquer dispositivo de medição de pressão que não seja atacado pelos gases de combustão ou produtos de decomposição e seja adequado a aumentos de pressão de 690-2 070 kPa em não mais de 5 minutos.

A extremidade do recipiente pressurizado mais distante da tomada de pressão é tapada com um obturador de ignição e munida de dois eléctrodos, um dos quais isolado do corpo do obturador e o outro ligado à massa. A extremidade oposta do recipiente é fechada por um disco de ruptura adequado a uma pressão de ruptura de 2 200 kPa, mantido em posição por um obturador de retenção com um furo axial de 20 mm de diâmetro. Se necessário, é instalada uma junta de material inerte, de modo a assegurar estanquidade aos gases. Durante a utilização, o dispositivo é mantido na posição correcta por meio de um suporte (figura 2), geralmente constituído por uma placa de aço macio com 235 mm × 184 mm × 6 mm e um tubo de 185 mm de comprimento e secção quadrada de 70 mm × 70 mm × 4 mm.

São cortados dois lados opostos na extremidade do tubo, de modo a obter uma estrutura constituída por uma secção de tubo intacto com 86 mm de comprimento prolongada por dois lados até à base. As extremidades destes lados são cortadas de modo a formar um ângulo de 60^{o} com a horizontal e soldadas à placa de aço macio que constitui a base. É maquinada num dos lados da extremidade superior da base uma fenda com 22 mm de largura e 46 mm de profundidade, de modo que, ao colocar o dispositivo pressurizado com o obturador de ignição para baixo, a tomada de pressão encaixe na fenda. É soldada à face interna do lado inferior do tubo um espaçador de aço com 30 mm de largura e 6 mm de espessura. O dispositivo pressurizado é mantido firmemente em posição por dois parafusos de orelhas de 7 mm, colocados no lado oposto, e apoiado inferiormente por dois elementos prismáticos de aço de 12 mm de largura e 6 mm de espessura, soldados às peças laterais na base da porção intacta do tubo.

▼B

1.6.1.2.2.
Sistema de ignição

O sistema de ignição é constituído por um cabo de níquel-crómio de 25 cm de comprimento e 0,6 mm de secção, com uma resistência de 3,85 ohm/m. O cabo é enrolado em forma de bobina por recurso a uma haste de 5 mm de secção, e ligado aos eléctrodos do obturador de ignição. A bobina deve apresentar uma das configurações que se ilustram na figura 3. A distância entre a extremidade inferior do recipiente e a superfície interior da bobina de ignição deve ser de 20 mm. Caso os eléctrodos não sejam ajustáveis, as extremidades do cabo de ignição entre a bobina e a base do recipiente devem ser isoladas por um elemento de cerâmica. O cabo é aquecido por acção de uma corrente contínua de intensidade mínima 10 A.

1.6.2. **Realização do ensaio** ([1])

O dispositivo completo, incluindo o transdutor de pressão e o sistema de aquecimento, mas sem o disco de ruptura na respectiva posição, é colocado com o obturador de ignição para baixo. Com o auxílio de um agitador de vidro ([2]), misturam-se num recipiente de vidro 2,5 g do líquido em estudo com 2,5 g de celulose seca. Por motivos de segurança, a mistura deve ser executada com um dispositivo de segurança interposto entre o operador e a mistura. Em caso de ignição durante os processos de mistura ou o enchimento, não é necessário prosseguir o ensaio. A mistura é vertida em pequenas porções no recipiente pressurizado, agitando ligeiramente, devendo assegurar-se a acumulação em torno da bobina de ignição, de forma a estabelecer um bom contacto. A bobina não deve ser distorcida durante o processo de enchimento, facto que poderia determinar resultados erróneos ([3]). O disco de ruptura é colocado na respectiva posição e o obturador de retenção enroscado firmemente. O recipiente carregado, com o disco de ruptura no topo, é transferido para o suporte, que deve estar colocado numa chaminé ou câmara com protecção. A fonte de alimentação é ligada aos terminais externos do obturador de ignição, aplicando-se uma corrente de 10 A. O tempo decorrido entre o início da mistura e o estabelecimento da corrente eléctrica não deve exceder 10 minutos.

O sinal produzido pelo transdutor de pressão é transmitido a um sistema adequado que permita a detecção e o registo contínuos da alteração da pressão (por exemplo, um detector em contínuo acoplado a um registador). A mistura é aquecida até à ruptura do disco de ruptura ou até terem decorrido, pelo menos, 60 segundos. Caso o disco não sofra ruptura, deve deixar-se arrefecer a mistura antes de desmontar cuidadosamente o dispositivo, tomando as precauções inerentes a uma eventual pressurização. Realizam-se cinco ensaios com a substância em estudo e a(s) substância(s) de referência. Regista-se o tempo necessário para a pressão aumentar de 690 kPa para 2 070 kPa acima da pressão atmosférica, calculando-se então o tempo médio necessário para o aumento da pressão.

Algumas substâncias produzem um aumento de pressão excessivo ou demasiado reduzido, determinado por reacções químicas independentes das propriedades de comburência das substâncias. Nesses casos, pode ser necessário repetir o ensaio, utilizando uma substância inerte, como, por exemplo, terra de diatomáceas (*kieselguhr*), em vez da celulose, de modo a esclarecer a natureza da reacção.

([1]) As misturas de substâncias comburentes com celulose devem ser consideradas potencialmente explosivas, devendo manipular-se com os devidos cuidados.

([2]) Na prática, pode preparar-se uma quantidade de mistura na proporção 1:1 do líquido em estudo com celulose superior à necessária para o ensaio, transferindo 5 ± 0,1 g da mesma para o recipiente pressurizado. A mistura deve ser preparada antes de cada ensaio.

([3]) Deve evitar-se, em especial, o contacto entre espiras adjacentes da bobina.

▼B

2. **DADOS**

Tempos necessários para o aumento da pressão da(s) substância(s) em estudo e de referência. Tempos necessários para o aumento da pressão no caso dos ensaios com substâncias inertes, se for caso disso.

2.1. TRATAMENTO DOS RESULTADOS

Calculam-se os tempos médios necessários para o aumento da pressão da(s) substância(s) em estudo e de referência.

Calcula-se o tempo médio necessário para o aumento da pressão no ensaio com a substância inerte, se realizado.

O quadro 1 fornece alguns exemplos de resultados:

Quadro 1

Exemplos de resultados [a]

Substância [b]	Tempo médio necessário para o aumento da pressão (mistura com celulose na proporção 1:1) (ms)
Solução aquosa saturada de dicromato de amónio	20 800
Solução aquosa saturada de nitrato de cálcio	6 700
Solução aquosa saturada de nitrato férrico	4 133
Solução aquosa saturada de perclorato de lítio	1 686
Solução aquosa saturada de perclorato de magnésio	777
Solução aquosa saturada de nitrato de níquel	6 250
Ácido nítrico a 65 %	4 767 [c]
Ácido perclórico a 50 %	121 [c]
Ácido perclórico a 55 %	59
Solução aquosa a 30 % de nitrato de potássio	26 690
Solução aquosa saturada de nitrato de prata	[d]
Solução aquosa a 40 % de clorato de sódio	2 555 [c]
Solução aquosa a 45 % de nitrato de sódio	4 133
Substância inerte	
Água: celulose	[d]

[a] Ver a referência (1) para a classificação no âmbito da regulamentação da ONU em matéria de transporte de mercadorias perigosas.
[b] As soluções saturadas devem ser preparadas à temperatura de 20°C.
[c] Valor médio com base em ensaios de comparação interlaboratorial.
[d] Sem atingir a pressão máxima de 2 070 kPa.

▼B

3. **RELATÓRIO**

3.1. RELATÓRIO DE ENSAIO

O relatório de ensaio deve incluir as seguintes informações:

— identidade, composição, grau de pureza, etc., da substância em estudo,

— concentração da substância em estudo,

— procedimento utilizado para a secagem da celulose,

— teor de humidade da celulose utilizada,

— resultados das determinações,

— resultados dos ensaios com substâncias inertes, se for caso disso,

— tempos médios necessários para o aumento da pressão determinados,

— quaisquer eventuais alterações do método e respectiva motivação,

— quaisquer informações complementares ou observações úteis para a interpretação dos resultados.

3.2. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS ([1])

Os resultados do ensaio são interpretados com base nos seguintes critérios:

a)
Eventual ignição espontânea da mistura da substância em estudo com celulose; e

b)
Comparação do tempo médio necessário para o aumento da pressão de 690 kPa para 2 070 kPa com idêntico parâmetro da(s) substância(s) de referência.

Uma substância líquida é considerada comburente se:

a) Uma mistura da substância com celulose na proporção 1:1, em massa, exibir ignição espontânea; ou

b) Uma mistura na proporção 1:1, em massa, exibir um tempo médio necessário para o aumento da pressão inferior ou igual ao tempo médio necessário para o aumento da pressão de uma mistura na proporção 1:1, em massa, de solução aquosa de ácido nítrico a 65 % (em massa) e celulose.

De modo a evitar falsos resultados positivos, podem ser também tidos em conta na interpretação dos resultados, se tal for considerado necessário, os resultados obtidos num ensaio da substância em estudo com uma substância inerte.

([1]) Ver a referência n.º 1 para a interpretação dos resultados no âmbito da regulamentação da ONU relativa ao transporte de mercadorias perigosas, utilizando várias substâncias de referência.

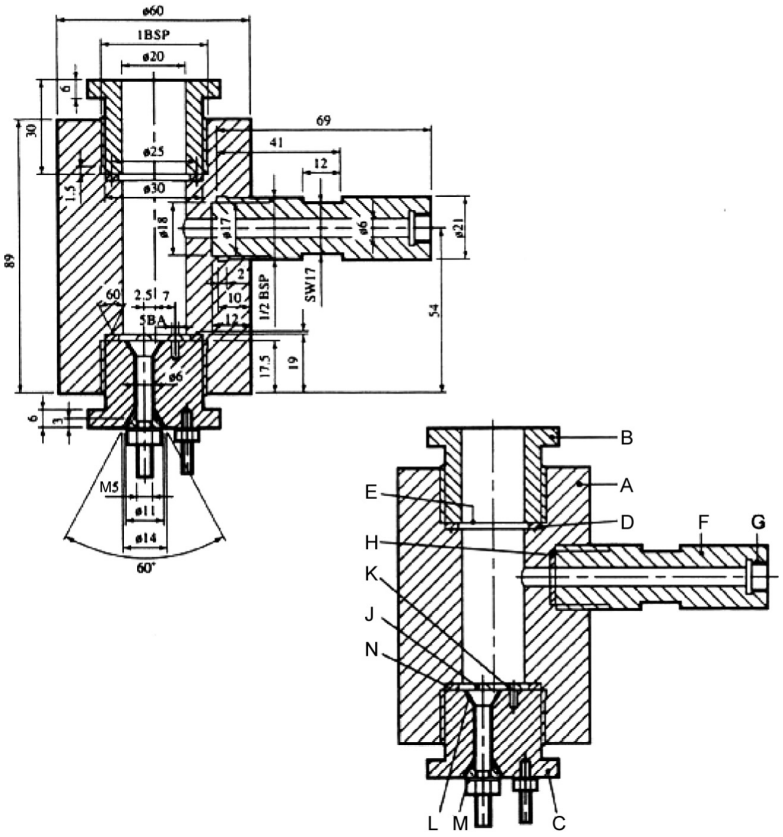
▼B

4. **REFERÊNCIAS**

(1) *Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Manual of Tests and Criteria*, 3.º edição revista. Publicação da ONU No: ST/SG/AC.10/11/Rev. 3, 1999, p. 342. *Test 0.2: Test for oxidizing liquids.*

Figura 1

Dispositivo pressurizado



(A) Corpo do recipiente pressurizado

(B) Obturador de suporte do disco de ruptura

(C) Obturador de ignição

(D) Junta de chumbo macio

(E) Disco de ruptura

(F) Tomada de pressão

(G) Cabeça do transdutor de pressão

(H) Junta

(J) Eléctrodo isolado

(K) Eléctrodo ligado à massa

(L) Isolador

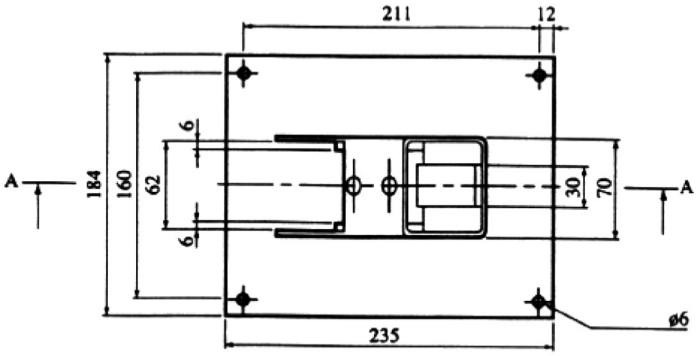
(M) Cone de aço

(N) Ranhura de distorção da junta

▼B

Figura 2

Suporte do dispositivo



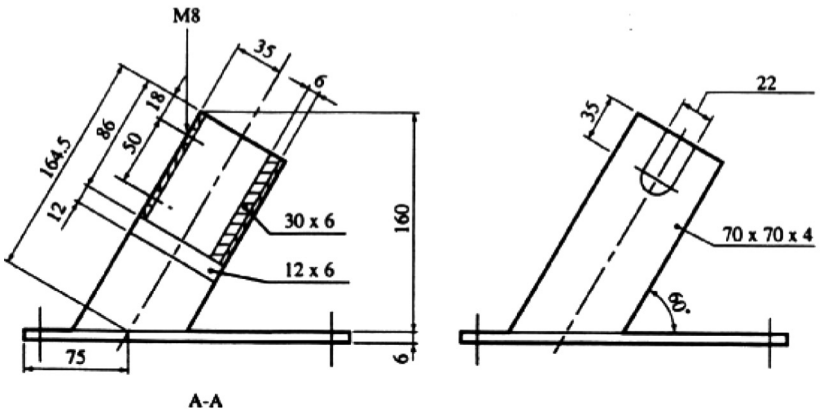
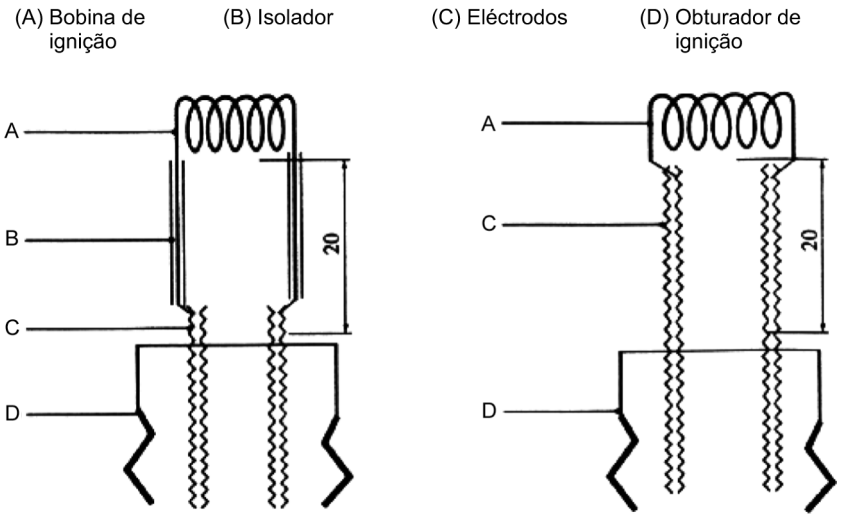


Figura 3

Sistema de ignição



Nota: Cada uma destas duas configurações pode ser utilizada

▼M1

A.22. DIÂMETRO MÉDIO GEOMÉTRICO PONDERADO EM FUNÇÃO DO COMPRIMENTO DE FIBRAS

1. MÉTODO

1.1. INTRODUÇÃO

O presente método descreve um procedimento para medição do diâmetro médio geométrico ponderado em função do comprimento (LWGMD) de lotes de fibras minerais artificiais (FMA). Dado que o LWGMD do material terá uma probabilidade de 95 % de se encontrar no interior dos níveis de confiança a 95 % (LWGMD ± dois desvios-padrão) da amostra, o valor apresentado (resultado do teste) será o valor inferior do intervalo de confiança a 95 % da amostra (ou seja, LWGMD — 2 desvios-padrão). O método baseia-se numa actualização (Junho de 1994) de um projecto de procedimento industrial do HSE (Departamento de Saúde e Segurança Britânico) adoptado numa reunião entre o ECFIA e o HSE em Chester, em 26/9/93, e desenvolvido para e por um segundo ensaio interlaboratorial (1, 2). Este método de medição pode ser utilizado para caracterizar o diâmetro das fibras em lotes de substâncias ou produtos que contenham FMA, nomeadamente fibras cerâmicas refractárias (FCR), fibras vítricas artificiais (FVA), fibras cristalinas e fibras policristalinas.

A ponderação em função do comprimento é uma forma de compensar o efeito de distribuição dos diâmetros causada pela quebra das fibras longas durante a amostragem ou manuseamento dos materiais. Na medição da distribuição por tamanhos do diâmetro das FMA utilizam-se métodos estatísticos geométricos (média geométrica), visto que essa distribuição se aproxima geralmente da distribuição logarítmica normal.

A medição do comprimento em complemento da medição do diâmetro é tediosa e demorada, mas se se medirem apenas as fibras que tocam uma linha infinitamente fina em cada campo de visão do miscroscópio electrónico, a probabilidade de que uma determinada fibra seja seleccionada é proporcional ao seu comprimento. Na medida em que esse facto resolve a questão do comprimento e da sua ponderação nos cálculos, a única medição necessária é a do diâmetro, e o LWGMD-2SD pode ser calculado como se descreve.

1.2. DEFINIÇÕES

Partícula: Um objecto em que a relação do comprimento com a espessura é menor do que 3:1.

Fibra: Um objecto em que a relação do comprimento com a espessura (razão de forma) é igual ou superior a 3:1.

1.3. ÂMBITO E LIMITAÇÕES

O método foi concebido para a análise da distribuição dos diâmetros nos casos em que o diâmetro médio varia entre 0,5 μm e 6 μm. Os diâmetros superiores podem ser medidos utilizando a microscopia electrónica com menor ampliação, mas o método terá limitações cada vez maiores quanto mais finas sejam as fibras, pelo que se recomenda, quando o diâmetro médio for inferior a 0,5 μm, a utilização de um microscópio electrónico de transmissão (MET) para a medição do diâmetro das fibras.

▼M1

1.4. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

Retira-se um determinado número de amostras representativas das mantas de fibra ou dos lotes de fibras soltas. Reduz-se o comprimento das fibras através de um procedimento de esmagamento e dilui-se em água uma subamostra representativa. Extraem-se aliquotas que são filtradas em filtro de policarbonato com uma dimensão de poro de 0,2 μm e preparadas para serem examinadas utilizando técnicas de microscopia electrónica de varrimento (MEV). O diâmetro das fibras é medido com uma ampliação de 10 000 x ou superior ([1]) utilizando o método da intersecção com uma linha para obtenção de uma estimativa do diâmetro médio não afectada de erro sistemático. O limite inferior do intervalo de confiança a 95 % (com base num teste unicaudal) é calculado para obter uma estimativa do valor inferior da média geométrica do diâmetro das fibras presentes no material.

1.5. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.5.1. **Segurança/precauções**

A exposição física às fibras em suspensão no ar deve ser reduzida ao mínimo, pelo que o manuseamento das fibras secas deve ser feito em câmara de fluxo laminar (*hotte*) ou caixa de luvas. A exposição física deve ser objecto de seguimento periódico que permita avaliar a eficácia dos métodos de controlo. Durante o manuseamento de FMA, devem ser utilizadas luvas descartáveis, para reduzir a irritação da pele e para evitar a contaminação cruzada.

1.5.2. **Aparelhos / equipmento**

— Prensa (capaz de produzir 10 MPa) e cadinhos,

— Filtros capilares de policarbonato com diâmetro de poro de 0,2 μm (25 mm de diâmetro),

— Filtro de membranas em éster de celulose com diâmetro de poro de 5 μm, para suporte durante a filtração,

— Aparelho de filtração em vidro (ou sistema de filtração descartável) que aceite filtros de 25 mm de diâmetro (p.ex.: sistema de microanálise em vidro da Millipore, tipo XX10 025 00),

— Água recém-destilada filtrada a 0,2 μm para remoção dos microorganismos,

— Aparelho de revestimento a quente com eléctrodo em ouro ou ouro/paládio,

— Microscópio electrónico de varrimento com capacidade de resolução a 10 nm e com ampliação de 10 000 x,

— Diversos: espátulas, lâmina de bisturi tipo 24, tesouras, tubos de MEV, cola ou fita adesiva de carbono, prata coloidal,

— Sonda de ultra-sons ou banho ultra-sónico de bancada,

— Amostrador ou sonda para recolha de amostras cilíndricas das mantas de FMA.

([1]) Esta é a ampliação indicada para as fibras de 3 μm; no caso das fibras de 6 μm poderá ser mais indicado utilizar uma ampliação de 5 000 x.

▼M1

1.5.3. **Procedimento de ensaio**

1.5.3.1. *Amostragem*

No caso das mantas e placas, um amostrador ou sonda de 25 mm de diâmetro é utilizado para a recolha de amostras em toda a secção. Essas amostras devem ser igualmente espaçadas por toda a largura nas peças pequenas ou retiradas aleatoriamente de diversas áreas quando as peças sejam longas. O mesmo equipamento pode ser utilizado para retirar amostras aleatórias no caso de fibras soltas. Quando possível, devem ser retiradas seis amostras, por forma a reflectir as variações espaciais do material.

Esmaga-se as seis amostras num cadinho de 50 mm de diâmetro a 10 MPa. O material é re-homogeneizado com uma espátula e prensado uma segunda vez a 10 Mpa, podendo depois ser removido do cadinho e armazenado num frasco de vidro selado.

1.5.3.2. *Preparação das amostras*

Se necessário, qualquer ligante orgânico poderá ser removido colocando a fibra numa estufa a 450 °C durante cerca de uma hora.

Formar um cone e dividir em quatro para obter subamostras (este passo deve ser realizado em câmara de fluxo laminar).

Utilizando uma espátula, adicionar uma pequena quantidade (< 0,5 g) de amostra a 100 ml de água acabada de destilar e filtrada através de um filtro de membrana de 0,2 μm (poderão ser utilizadas fontes alternativas de água ultrapura, desde que se demonstre que a sua qualidade é satisfatória). Dispersar totalmente utilizando uma sonda de ultra-sons com uma potência de 100 W regulada de forma a produzir cavitação. (Se esse tipo de sonda não estiver disponível, utilizar o seguinte método: agitar e inverter a amostra repetidamente durante 30 segundos; passar por ultra-sons num banho ultra-sónico de bancada durante cinco minutos; voltar a agitar e inverter repetidamente durante mais 30 segundos).

Imediatamente após a dispersão da fibra, remover um determinado número de aliquotas (p.ex.: três aliquotas de 3, 6 e 10 ml) utilizando uma pipeta de boca larga (com uma capacidade de 2 a 5 ml).

Filtrar todas as aliquotas em vácuo através de um filtro de policarbonato com poro de 0,2 μm, suportado por um filtro de suporte MEC com poro de 5 μm, utilizando um funil de filtração em vidro de 25 mm com um reservatório cilíndrico. Colocam-se primeiro cerca de 5 ml da água destilada filtrada no funil e a aliquota é depois lentamente pipetada para a água com a ponta da pipeta abaixo do menisco. A pipeta e o reservatório devem ser cuidadosamente lavadas depois de pipetar, dado que as fibras mais finas têm tendência para se concentrarem perto da superfície.

Remover cuidadosamente o filtro e separá-lo do filtro de suporte antes de o colocar num recipiente para secagem.

▼M1

Cortar uma secção de um quarto ou metade do filtrado com uma lâmina de bisturi de tipo 24, fazendo movimentos laterais durante o corte. Colar cuidadosamente a secção cortada num suporte de SEM utilizando fita ou cola de carbono. Aplicar prata coloidal em pelo menos três sítios para melhorar o contacto eléctrico entre a borda do filtro e o suporte. Quando a cola/prata coloidal estiverem secos, revestir a superfície do depósito a quente com aproximadamente 50 nm de ouro ou de ouro/paládio.

1.5.3.3. *Calibração e operação do MEV*

1.5.3.3.1. Calibração

A calibração do MEV deve ser verificada pelo menos uma vez por semana (idealmente uma vez por dia) utilizando uma grelha de calibração normalizada. A calibração deve ser verificada utilizando uma amostra-padrão, e se o valor medido (MEV) não se encontrar num intervalo de ± 2 % do respectivo valor, o MEV deve ser novamente calibrado e o procedimento de verificação deve ser repetido.

O MEV deve ter uma resolução que permita um diâmetro mínimo de campo de pelo menos 0,2 μm, utilizando uma matriz de amostra real, com uma ampliação de 2 000 x.

1.5.3.3.2. Operação

O MEV deve ser operado com uma ampliação de 10 000 x ([1]) em condições que permitam uma boa resolução, com imagem aceitável, a baixas velocidades de varrimento, por exemplo de 5 segundos por imagem. Embora os parâmetros operacionais de diferentes MEV possam variar, em geral obtém-se a melhor visibilidade e resolução, em materiais de peso atómico relativamente baixo, utilizando voltagens de aceleração de 5-10 keV e trabalhando com um pequeno diâmetro de feixe (*spot size*) e com uma distância de trabalho curta. Dado que se vai utilizar a linha mediana como referência, deve utilizar-se uma inclinação de 0^{o}, para evitar a necessidade de voltar a focar ou, no caso de MEV com um módulo eucêntrico, utilizar a distância de trabalho eucêntrica. Pode trabalhar-se com menor ampliação desde que o material não contenha nenhuma fibra de pequeno diâmetro e que o diâmetro das fibras seja grande (> 5 μm).

1.5.3.4. *Medição do diâmetro*

1.5.3.4.1. Exame com baixa ampliação para avaliação da amostra

A amostra deve ser inicialmente examinada com baixa ampliação para verificar se não existem aglomerados de fibras de grandes dimensões e para avaliar a densidade de fibras na amostra. Caso haja muita aglomeração, recomenda-se a preparação de uma nova amostra.

Para fins de exactidão estatística, é necessário proceder à medição de um número mínimo de fibras, pelo que poderá parecer desejável dispor de maior densidade de fibras, na medida em que o exame de campos vazios leva tempo e não contribui em nada para a análise. No entanto, se o filtro estiver sobrecarregado, torna-se difícil medir o diâmetro de todas as fibras e as fibras de menor diâmetro podem ser escondidas por outras de maior diâmetro.

([1]) Para as fibras de 3 μm, ver a nota de pé de página anterior.

▼**M1**

Uma densidade de fibras superior a 150 fibras por milímetro linear poderá resultar numa sobreestimação do LWGMD. Por outro lado, a baixa concentração de fibras aumentará o tempo necessário para a análise, pelo que frequentemente é mais útil preparar uma nova amostra com uma densidade de fibras próxima da ideal do que persistir nas contagens de filtros em que a concentração de fibras é baixa. A densidade ideal das fibras deverá resultar, em média, em uma ou duas fibras que podem ser medidas por cada campo de visão, com uma ampliação de 5 000 x. A densidade ideal depende, contudo, do diâmetro das fibras, pelo que é necessário que o operador utilize a sua experiência e discernimento para decidir se a densidade de fibras está ou não próxima do ideal.

1.5.3.4.2. Ponderação do diâmetro das fibras em função do comprimento

Só devem ser contadas as fibras que toquem (ou interceptem) uma linha (infinitamente) fina traçada no ecrã do MEV. Para tal, deve ser traçada no centro do ecrã uma linha horizontal (ou vertical).

Em alternativa, pode colocar-se um ponto no centro do ecrã e proceder depois a um exame linear contínuo ao longo do filtro numa determinada direcção. O diâmetro de todas as fibras com uma razão de forma superior a 3:1 que toquem ou interceptem esse ponto deverá ser medido e registado.

1.5.3.4.3. Medição das fibras

Recomenda-se que sejam medidas pelo menos 300 fibras. Cada fibra deve ser medida uma única vez no ponto de intersecção com o ponto ou linha traçados no ecrã (ou perto do ponto de intersecção se a parede exterior da fibra estiver escondida). Caso se encontrem fibras de secção irregular, deve ser feita uma medição que represente o diâmetro médio da fibra. Os pontos de medição na parede exterior da fibra devem ser cuidadosamente definidos antes da medição da distância que separa os dois pontos opostos. A medição pode ser efectuada em linha, no ecrã, ou *a posteriori*, em imagens armazenadas ou fotografias. Recomenda-se a utilização de sistemas semi-automáticos de medição em imagens que transferem os dados directamente para uma folha de cálculo, na medida em que permitem poupar tempo, eliminar os erros de transcrição e automatizar o processo de cálculo.

As extremidades das fibras mais longas devem ser observadas a baixa ampliação para verificar se não estão a encaracolar de volta para o campo de visão, por forma a garantir que só sejam medidas uma única vez.

2. **DADOS**

2.1. TRATAMENTO DOS RESULTADOS

Geralmente, os diâmetros das fibras não apresentam uma distribuição normal. No entanto, é possível obter uma distribuição que se aproxima da normal através de uma transformação logarítmica.

Calcular a média aritmética (lnD médio) e o desvio-padrão (SD_{lnD}) dos valores do logaritmo neperiano (lnD) dos n diâmetros de fibra (D).

$$\text{médio lnD} = \frac{\sum \text{lnD}}{\text{n}} \qquad (1)$$

▼**M1**

$$SD_{lnD} = \sqrt{\frac{\sum(lnD - \text{médio } lnD)^2}{n - 1}} \quad (2)$$

O desvio-padrão é dividido pela raíz quadrada do número de medições (n) para obter o erro-padrão (SE_{lnD}).

$$SE_{lnD} = \frac{SD}{\sqrt{n}} \quad (3)$$

Substrair o dobro do erro-padrão da média e calcular o exponencial desse valor (média menos dois erros-padrão) para obter a média geométrica menos dois erros-padrão geométricos.

$$LWGMD - 2SE = e^{(\text{médio } lnD - 2SE_{lnd})} \quad (4)$$

3. **APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS**

RELATÓRIO DE ENSAIO

O relatório de ensaio deve incluir pelo menos a seguinte informação:

— Valor de LWGMD-2SE.

— Todos os desvios, em particular os que possam ter efeitos sobre a precisão ou a fiabilidade dos resultados, com a devida justificação.

4. **BILBLIOGRAFIA**

1. B. Tylee SOP MF 240. Health and Safety Executive. February 1999.

2. G. Burdett and G. Revell. Development of a standard method to measure the length-weigthed geometric mean fibre diameter: Results of the Second inter-laboratory exchange. IR/L/MF/94/07. Project R42.75 HPD. Health and Safety Executive. Research and Laboratory Services Division. 1994.

▼M4

A.23 COEFICIENTE DE PARTIÇÃO (1-OCTANOL/ÁGUA): MÉTODO DE AGITAÇÃO LENTA

INTRODUÇÃO

1. Este método é equivalente ao *Test Guideline* TG 123 (2006) da OCDE. O método da agitação lenta permite determinar com exatidão valores de coeficiente de partição 1-octanol/água (P_{OW}) até log P_{OW} = 8,2 (1). É, portanto, um método experimental adequado para a determinação direta do P_{OW} de substâncias fortemente hidrofóbicas.

2. Outros métodos de determinação do coeficiente de partição 1-octanol/água (P_{OW}) são o método dito "do frasco com agitação" (2) e o método de determinação do P_{OW} com base nos fenómenos de retenção em HPLC de inversão de fases (3). O método do frasco com agitação pode conduzir a resultados anómalos, devido à transferência de microgotículas de octanol para a fase aquosa. À medida que aumenta o valor de P_{OW}, a presença dessas gotículas na fase aquosa leva a que a concentração da substância em estudo nessa fase seja cada vez mais sobrestimada. A utilização desse método está, portanto, limitada a substâncias com P_{OW} inferior a 4. O segundo método utiliza valores consistentes de P_{OW}, determinados diretamente, para calibrar a relação entre os fenómenos de retenção em HPLC e os valores medidos de P_{OW}. Existia um projeto de orientações da OCDE para a determinação de coeficientes de partição 1-octanol/água de substâncias ionizáveis, que foi abandonado (4).

3. O presente método foi desenvolvido nos Países Baixos. A precisão das metodologias descritas neste método foi validada e otimizada num estudo de validação interlaboratorial em que participaram 15 laboratórios (5).

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Significado e utilização

4. Foram identificadas relações muito significativas entre o coeficiente de partição 1-octanol/água (P_{OW}) de substâncias orgânicas inertes e a bioacumulação dessas substâncias nos peixes. Além disso, demonstrou-se a existência de uma correlação entre o P_{OW} e a toxicidade para os peixes e entre o P_{OW} e a sorção dos produtos químicos por meios sólidos, como solos e sedimentos. A referência 6 descreve exaustivamente essas relações.

5. Concluiu-se que existe uma grande variedade de relações entre o coeficiente de partição 1-octanol/água e outras propriedades das substâncias, com importância ao nível da química e toxicologia ambientais. Assim, o coeficiente de partição 1-octanol/água tem vindo a tornar-se um parâmetro fundamental na avaliação do risco ambiental dos produtos químicos e na previsão do destino desses produtos no ambiente.

Âmbito de aplicação

6. O método da agitação lenta foi concebido para reduzir a formação de microgotículas de 1-octanol na fase aquosa. Nessas condições, já não se verifica a sobrestimação da concentração na fase aquosa, devida à associação de moléculas da substância em estudo a essas gotículas. O método da agitação lenta é, portanto, particularmente adequado para a determinação do P_{OW} de substâncias com log P_{OW} previsto igual ou superior a 5, caso em que o método do frasco com agitação (2) tende a fornecer resultados erróneos.

▼M4

DEFINIÇÃO E UNIDADES

7. O coeficiente de partição de uma substância entre a água e um solvente lipofílico (1-octanol) caracteriza a distribuição no equilíbrio do produto químico entre as duas fases. O coeficiente de partição entre a água e o 1-octanol (P_{OW}) é definido como a razão entre a concentração, no equilíbrio (C_O), da substância em estudo em 1-octanol saturado com água e a concentração, no equilíbrio (C_W), da substância em estudo em água saturada com 1-octanol.

$$P_{OW} = C_O/C_W$$

Como se trata de um quociente de concentrações, é uma grandeza adimensional. É mais frequentemente apresentado como logaritmo decimal (log P_{OW}). Dado que o P_{OW} depende da temperatura, os dados apresentados devem mencionar a temperatura das determinações.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

8. Para a determinação do coeficiente de partição, estabelece-se um equilíbrio entre a água, o 1-octanol e a substância em estudo, a temperatura constante, determinando-se em seguida a concentração da substância em estudo nas duas fases.

9. As dificuldades experimentais ligadas à formação de microgotículas durante o ensaio do frasco com agitação podem ser atenuadas no ensaio de agitação lenta aqui proposto. No ensaio de agitação lenta, estabelece-se um equilíbrio entre a água, o 1-octanol e a substância em estudo, num reator com agitação termostatizado. As transferências de uma fase para a outra são aceleradas pela agitação. Esta provoca um grau de turbulência limitado, que favorece as transferências entre o 1-octanol e a água, sem formação de microgotículas (1).

APLICABILIDADE DO ENSAIO

10. Dado que a presença de substâncias diversas da substância em estudo pode influenciar o coeficiente de atividade desta última, a substância em estudo utilizada nos ensaios deve ser pura. Na determinação de coeficientes de partição 1-octanol/água devem ser utilizadas substâncias com o maior grau de pureza disponível no comércio.

11. O presente método aplica-se a substâncias puras que não se dissociem nem associem, nem apresentem atividade interfacial significativa. Pode utilizar-se na determinação do coeficiente de partição 1-octanol/água de substâncias com essas características ou de misturas dessas substâncias. Se o método for utilizado para misturas, os coeficientes de partição 1-octanol/água determinados dependerão da composição química da mistura estudada e da composição eletrolítica da fase aquosa. Desde que seja devidamente complementado, o método também é aplicável a compostos dissociáveis ou associáveis (ver o ponto 12).

12. Devido aos equilíbrios múltiplos que se geram na água e no 1-octanol e influenciam a partição 1-octanol/água das substâncias dissociáveis, como os ácidos orgânicos e os fenóis, as bases orgânicas e as substâncias organometálicas, o coeficiente de partição 1-octanol/água é uma constante fortemente dependente da composição eletrolítica (7)(8). A determinação deste coeficiente exige, portanto, o controlo e registo do pH e da composição eletrolítica durante o ensaio. A avaliação de coeficientes de partição cabe a especialistas. Com base na(s) constante(s) de dissociação, há que selecionar valores de pH adequados, de modo a poder determinar-se um coeficiente de partição para cada estado de ionização. O estudo de compostos organometálicos exige a utilização de tampões não complexantes (8). As condições experimentais devem ser escolhidas tendo em conta os conhecimentos atuais no domínio da química em fase aquosa (constantes de complexação, constantes de dissociação) e de modo a poder prever-se que espécies da substância em estudo estarão presentes nessa fase. A força iónica deverá ser a mesma em todos os ensaios efetuados, utilizando-se para o efeito um eletrólito apropriado.

▼M4

13. As substâncias com baixa hidrossolubilidade ou P_{OW} elevado podem dificultar os ensaios, devido ao facto de as concentrações na fase aquosa se tornarem muito baixas e ser difícil a sua determinação rigorosa. Na descrição deste método de ensaio explica-se como ultrapassar o problema.

INFORMAÇÕES SOBRE A SUBSTÂNCIA EM ESTUDO

14. Os reagentes químicos devem ser de qualidade analítica ou de grau de pureza superior. Recomenda-se a utilização de substâncias em estudo não marcadas, de composição química conhecida (de preferência, pelo menos 99 % puras), ou marcadas com isótopos radioativos, de composição química e grau de pureza radioquímica conhecidos. No caso de marcadores com período de semidesintegração curto, será necessário efetuar as correções devidas à desintegração. No caso de substâncias em estudo marcadas com isótopos radioativos, deve recorrer-se a um método analítico específico da substância, para garantir que a radioatividade medida esteja diretamente relacionada com a substância em causa.

15. Pode estimar-se o log P_{OW} utilizando *software* disponível no mercado para esse efeito, ou com base na razão entre a solubilidade em cada um dos solventes.

16. Antes de se proceder a um ensaio de agitação lenta para determinação de um P_{OW}, deve dispor-se das seguintes informações sobre a substância em estudo:

a) fórmula estrutural;

b) métodos analíticos adequados para determinar a concentração da substância em água e em 1-octanol;

c) constante(s) de dissociação, no caso das substâncias ionizáveis (Orientações n.º 112 da OCDE) (9);

d) hidrossolubilidade (10);

e) hidrólise abiótica (11);

f) biodegradabilidade "fácil" (12);

g) pressão de vapor (13).

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Material e aparelhagem

17. É necessário o material de laboratório de uso corrente, nomeadamente o seguinte:

— agitadores magnéticos e barras magnéticas revestidas de Teflon, para agitar a fase aquosa,

— aparelhagem analítica adequada para determinar as concentrações esperadas da substância em estudo,

— recipiente de agitação com uma torneira no fundo. Em função do log P_{OW} previsto e do limite de deteção (LOD) do composto em estudo, ponderar-se-á a utilização de um recipiente de reação com a mesma geometria e volume superior a um litro, para se obter um volume de água suficiente para a extração e a análise químicas. Este procedimento permitirá obter concentrações mais elevadas no extrato aquoso e possibilitará, portanto, uma determinação analítica mais fiável. Figura no apêndice 1 um quadro de estimativas do volume mínimo necessário, em função do LOD, do log P_{OW} estimado e da hidrossolubilidade do composto. O quadro tem por base a relação entre o log P_{OW} e a razão das solubilidades em octanol e em água, segundo Pinsuwan *et al.* (14):

$$\log P_{OW} = 0,\ 88 \log SR + 0,\ 41$$

▼M4

em que:

$SR = S_{octanol}/S_{água}$ (em molaridade),

bem como a relação apresentada por Lyman (15) para estimativas de hidrossolubilidade. As hidrossolubilidades calculadas através da equação do apêndice 1 devem considerar-se uma primeira estimativa. Note-se que o utilizador é livre de efetuar estimativas da hidrossolubilidade por meio de qualquer correspondência que se considere representar melhor a relação entre a hidrofobicidade e a solubilidade. Por exemplo, no caso dos compostos sólidos, recomenda-se que o ponto de fusão seja tido em conta nas previsões de solubilidade. Se for utilizada uma equação modificada, deve garantir-se a validade da equação utilizada para o cálculo da solubilidade em octanol. A figura do apêndice 2 esquematiza um recipiente de agitação, com camisa de vidro, com cerca de um litro de capacidade. As proporções do recipiente ilustrado no apêndice 2 revelaram-se favoráveis e, se forem utilizados recipientes de volume diferente, devem ser mantidas;

— um meio de manter a temperatura constante (aspeto essencial) durante o ensaio com agitação lenta.

18. Os recipientes devem ser de um material inerte, para que a adsorção à sua superfície seja insignificante.

Preparação das soluções a utilizar nos ensaios

19. A determinação do P_{OW} deve ser efetuada com 1-octanol do grau de pureza mais elevado disponível no mercado (grau de pureza mínimo de 99 %). Recomenda-se a purificação do 1-octanol por extração ácida, básica e com água, seguida de secagem. Também pode purificar-se o 1-octanol por destilação. Na preparação das soluções-padrão da substância em estudo deve utilizar-se 1-octanol purificado. A água a utilizar na determinação do P_{OW} deve ser destilada em material de vidro ou de quartzo ou ser proveniente de um sistema de purificação ou ser própria para HPLC. A água destilada deve ser filtrada através de um filtro de 0,22 μm e devem ser previstos ensaios em branco, para verificar se os extratos concentrados contêm impurezas que possam interferir com a substância em estudo. Caso se utilize um filtro de fibra de vidro, este deve ser limpo por aquecimento em estufa, durante pelo menos três horas, a 400 °C.

20. Antes do ensaio, os solventes são mutuamente saturados e levados ao equilíbrio num recipiente suficientemente grande. Para o efeito, o sistema constituído pelas duas fases é mantido sob agitação durante dois dias.

21. Toma-se e dissolve-se em 1-octanol (saturado com água) um volume apropriado, à concentração requerida, da substância em estudo. O coeficiente de partição 1-octanol/água tem de ser determinado em soluções diluídas em 1--octanol e em água. A concentração da substância em estudo não deve, portanto, exceder 70 % da solubilidade desta, sendo 0,1 M a concentração máxima em cada fase (1). As soluções de 1-octanol utilizadas no ensaio não podem conter partículas sólidas, em suspensão, da substância em estudo.

22. Dissolve-se em 1-octanol (saturado com água) uma quantidade apropriada da substância em estudo. Se for previsto um log P_{OW} superior a cinco, as soluções de 1-octanol utilizadas no ensaio não devem conter partículas sólidas, em suspensão, da substância em estudo. Para o efeito, proceder-se-á do seguinte modo, no caso dos produtos químicos com log P_{OW} superior a 5:

— dissolve-se a substância em estudo em 1-octanol (saturado com água),

▼M4

— deixa-se a solução em repouso durante um período suficiente para que a substância sólida em suspensão deposite. Durante a decantação, mede-se continuamente a concentração da substância em estudo,

— depois de as concentrações medidas na solução de 1-octanol terem estabilizado, dilui-se a solução de reserva com um volume apropriado de 1-octanol,

— determina-se a concentração da solução de reserva diluída. Se a concentração determinada for coerente com a diluição, pode utilizar-se a solução de reserva diluída no ensaio de agitação lenta.

Extração e análise das amostras

23. Na determinação da substância em estudo deve utilizar-se um método analítico validado. Os investigadores terão de demonstrar que, durante o ensaio, as concentrações na fase de 1-octanol saturado em água e na fase aquosa saturada em 1-octanol são superiores ao limite de quantificação do método analítico utilizado. Se houver que recorrer a métodos de extração, será necessário determinar as recuperações analíticas da substância em estudo da fase aquosa e da fase de 1-octanol. O sinal analítico deve ser corrigido em função dos brancos e devem tomar-se as precauções necessárias para não haver transferências da substância em análise entre amostras.

24. Antes da análise, e em caso de concentrações baixas de substâncias em estudo hidrofóbicas na fase aquosa, é provável que seja necessário extrair a fase aquosa com um solvente orgânico e preconcentrar o extrato. Pela mesma razão, é necessário reduzir as concentrações finais nos brancos. Para o efeito, há que utilizar solventes de elevada pureza, de preferência solventes para análise de resíduos. Por outro lado, a utilização de material de vidro cuidadosamente limpo (por lavagem com solventes ou aquecimento a alta temperatura) pode ajudar a evitar contaminações cruzadas.

25. Para estimar o valor de log P_{OW}, pode utilizar-se um programa de estimativas ou recorrer-se a uma avaliação especializada. Se o valor for superior a 6, terá de se prestar muita atenção às correções em função dos brancos e às transferências da substância em análise. Além disso, se a estimativa de log P_{OW} for superior a 6, é obrigatório utilizar um padrão paralelo para corrigir a taxa de recuperação, de modo a obterem-se fatores de preconcentração elevados. Existem no mercado vários programas de *software* que fornecem estimativas de log P_{OW}, nomeadamente o Clog P (16), o KOWWIN (17), o ProLogP (18) e o ACD log P (19) ([1]). As referências 20 a 22 descrevem os métodos de estimativa.

26. Os limites de quantificação (LOQ) da substância em estudo em 1-octanol e em água determinam-se por métodos bem estabelecidos. Como regra prática, o limite de quantificação de um método corresponde à concentração em água ou em 1-octanol que gera um sinal dez vezes mais intenso que o ruído. Há que escolher um método adequado de extração e de preconcentração e também que especificar as recuperações analíticas. Deve selecionar-se um fator de preconcentração adequado, que permita obter sinais da intensidade requerida na determinação analítica.

([1]) Esta informação é prestada apenas a título indicativo. Podem ser utilizados programas informáticos equivalentes, desde que permitam obter resultados comprovadamente idênticos.

▼M4

27. Com base nos parâmetros do método analítico e nas concentrações esperadas, define-se um tamanho de amostra aproximado para a determinação rigorosa da concentração do composto em causa. Para se obterem sinais analíticos suficientes, deve evitar-se a utilização de amostras aquosas demasiado pequenas. Também deve evitar-se utilizar amostras aquosas demasiado grandes; caso contrário, a água disponível pode não ser suficiente para o número mínimo de análises exigido (n = 5). No apêndice 1, apresenta-se o volume mínimo de amostra em função do volume do recipiente, do LOD da substância em estudo e da solubilidade desta última.

28. A quantificação das substâncias em estudo efetua-se por comparação com curvas de calibração do composto em causa. As concentrações nas amostras analisadas devem estar compreendidas entre concentrações de padrões.

29. No caso das substâncias cuja estimativa de log P_{OW} seja superior a 6, há que adicionar um padrão paralelo à amostra aquosa antes da extração, para contabilizar as perdas ocorridas durante a extração e a preconcentração de amostras aquosas. Para possibilitar uma correção rigorosa da taxa de recuperação, os padrões paralelos devem ter propriedades muito próximas ou idênticas às da substância em estudo. De preferência, são utilizados análogos das substâncias em causa marcados com isótopos estáveis (por exemplo, análogos perdeuterados ou marcados com ^{13}C). Se não for possível utilizar isótopos marcadores estáveis (^{13}C ou ^{2}H), haverá que demonstrar, com base em dados fiáveis recolhidos na literatura científica, que as propriedades físico-químicas do padrão paralelo são muito próximas das propriedades da substância em estudo. Durante a extração líquido-líquido da fase aquosa, podem formar-se emulsões. Estas podem reduzir-se por adição de sal ou deixando-as decantar de um dia para o outro. Os métodos utilizados para extrair e preconcentrar as amostras devem ser indicados nos relatórios.

30. Antes de serem analisadas, as amostras tomadas da fase de 1-octanol podem, se necessário, diluir-se com um solvente adequado. Além disso, no caso das substâncias cujos ensaios de recuperação revelem grandes variações nos mesmos (desvio-padrão relativo superior a 10 %), recomenda-se a utilização de padrões paralelos, para corrigir as taxas de recuperação.

31. Os relatórios devem incluir uma descrição do método analítico que incida na técnica de extração, nos fatores de preconcentração e de diluição, nos parâmetros instrumentais, nas rotinas e no intervalo de calibração, na recuperação analítica da substância em estudo da fase aquosa, na adição de padrões paralelos para corrigir as taxas de recuperação, nos valores dos brancos e nos limites de deteção e de quantificação.

Realização do ensaio

Razões volumétricas 1-octanol/água ótimas

32. Ao escolher os volumes de água e de 1-octanol deve ter-se em conta o seguinte: o limite de quantificação em 1-octanol e em água, os fatores de preconcentração aplicados às amostras de água, os volumes das amostras de 1-octanol e de água colhidas e as concentrações previstas. Por razões experimentais, o volume de 1-octanol no sistema em agitação lenta deve ser escolhido de forma a obter-se uma fase de 1-octanol suficientemente espessa (mais de 0,5 cm), para que seja possível colher amostras dessa fase sem a perturbar.

33. Na determinação de compostos com log P_{OW} igual ou superior a 4,5, a relação entre os volumes de cada fase habitualmente utilizados é de 20 ml a 50 ml de 1-octanol para 950 ml a 980 ml de água, num recipiente de um litro.

▼M4

Condições de realização do ensaio

34. O recipiente de reação deve manter-se termostatizado durante o ensaio, de modo que as variações de temperatura sejam inferiores a 1 °C. O ensaio deve ser efetuado a 25 °C.

35. Deve proteger-se o dispositivo experimental da luz solar, efetuando o ensaio em câmara escura ou cobrindo o recipiente de reação com folha de alumínio.

36. Deve efetuar-se o ensaio num ambiente tão isento de poeiras quanto possível.

37. Agita-se o sistema 1-octanol/água até se atingir o equilíbrio. O período necessário é determinado num ensaio-piloto com agitação lenta, recolhendo-se regularmente amostras de água e de 1-octanol. O intervalo mínimo entre a colheita de amostras consecutivas é de cinco horas.

38. A determinação de um P_{OW} deve basear-se em, pelo menos, três ensaios com agitação lenta independentes.

Determinação do tempo necessário para atingir o equilíbrio

39. Considera-se que se atingiu o equilíbrio quando o gráfico da razão de concentrações 1-octanol/água em função do tempo, num período que abranja 4 momentos de colheita de amostras, se caracterizar por um declive não significativamente diferente de zero, para $p = 0,05$ (limite de confiança de 95 %). Deve atingir-se o equilíbrio pelo menos um dia antes de se iniciar a colheita de amostras. Como regra prática, a colheita de amostras de substâncias cuja estimativa de log P_{OW} seja inferior a 5 pode ter lugar ao segundo e ao terceiro dias. Caso se trate de substâncias particularmente hidrofóbicas, o período necessário para se atingir o equilíbrio pode ter de ser alargado. No caso de um composto com log P_{OW} de 8,23 (decaclorobifenilo), bastaram 144 horas para se atingir o equilíbrio. As amostras para determinação do estado de equilíbrio colhem-se num único recipiente.

Início do ensaio

40. No início do ensaio, enche-se o recipiente de reação com água saturada de 1-octanol. Deve esperar-se tempo suficiente para atingir a temperatura termostatizada.

41. Adiciona-se cuidadosamente ao recipiente de reação a quantidade pretendida da substância em estudo dissolvida no volume requerido de 1-octanol saturado com água. Esta etapa é crucial no ensaio, havendo que evitar uma mistura turbulenta das duas fases. Para o efeito, pode pipetar-se lentamente o 1-octanol contra a parede do recipiente, junto à superfície da água, de modo que escorra ao longo da parede de vidro e forme um filme por cima da fase aquosa. É totalmente de excluir que o 1-octanol seja simplesmente vertido para o recipiente. É igualmente de excluir que se deixem cair gotas de 1-octanol diretamente na água.

42. Depois de iniciada a agitação, deve aumentar-se gradualmente a velocidade desta. Se o motor de agitação não puder ser convenientemente regulado, deve ponderar-se a utilização de um transformador. Importa regular a velocidade de agitação de modo a formar-se um vórtice de profundidade compreendida entre 0,5 cm e 2,5 cm na interface entre a água e o 1-octanol. Se a profundidade do vórtice exceder 2,5 cm, deve reduzir-se a velocidade de agitação; caso contrário, poderão formar-se microgotículas na fase aquosa, a partir das gotas de 1-octanol geradas, com a consequente sobrestimação da concentração da substância em estudo na água. A velocidade de agitação que gera o vórtice máximo de 2,5 cm é recomendada com base nas conclusões de um estudo de validação interlaboratorial (5). Constitui um compromisso entre a rapidez com que se atinge o equilíbrio e a limitação da formação de microgotículas de 1-octanol.

▼M4

Colheita e tratamento das amostras

43. Antes da colheita das amostras, deve desligar-se o agitador e esperar-se que os líquidos se imobilizem. Depois de colhidas as amostras, volta a pôr-se o agitador lentamente em movimento, conforme descrito acima, aumentando-se gradualmente a velocidade de agitação.

44. Colhem-se as amostras da fase aquosa à saída da torneira existente no fundo do recipiente de reação. Rejeitar sempre o volume morto de água retido na torneira (cerca de 5 ml no recipiente ilustrado no apêndice 2); a água retida na torneira não é agitada e, portanto, não se encontra em equilíbrio com o resto do líquido. Registar o volume das amostras de água e não esquecer que a quantidade de substância em estudo presente na água rejeitada deve ser tida em conta no balanço de massas. Para minimizar as perdas por evaporação, deve verter-se cuidadosamente a água na ampola de decantação, de modo a não perturbar a interface água/1-octanol.

45. Constituem-se amostras de 1-octanol retirando uma pequena alíquota (cerca de 100 µl) da fase de 1-octanol, com uma seringa de vidro e metal de 100 microlitros. Devem tomar-se as precauções necessárias para não perturbar a interface. Registar o volume das amostras. É suficiente uma alíquota de pequeno volume, pois a amostra de 1-octanol vai ser diluída.

46. Devem evitar-se transferências desnecessárias das amostras. Para isso, deve determinar-se gravimetricamente o volume das amostras. No caso das amostras de água, poderá recolher-se cada amostra numa ampola de decantação que contenha já o volume de solvente necessário.

DADOS E RELATÓRIOS

47. Este método de ensaio prevê a determinação do coeficiente de partição 1-octanol/água (P_{OW}) com base em três ensaios com agitação lenta (três unidades experimentais), em condições idênticas, do composto em estudo. A correspondência utilizada para demonstrar que o equilíbrio foi atingido deve basear-se nos resultados de, pelo menos, quatro determinações de C_O/C_W em momentos consecutivos de colheita de amostras. Pode, assim, calcular-se a variância, como medida da incerteza do valor médio obtido em cada unidade experimental.

48. Pode caracterizar-se o valor de P_{OW} pela variância dos resultados obtidos em cada unidade experimental. Utiliza-se esta informação para calcular o P_{OW} como média ponderada dos resultados obtidos em cada uma das unidades. Para isso, utiliza-se como fator de ponderação o inverso da variância dos resultados de cada unidade experimental. Consequentemente, os dados com maior variação (expressa pela variância) e, portanto, menos fiáveis têm menos influência no resultado final do que os dados com menor variância.

49. Calcula-se também, de modo análogo, um desvio-padrão ponderado. Este parâmetro caracteriza a repetibilidade da medição do P_{OW}. Um valor baixo de desvio-padrão ponderado indica uma repetibilidade elevada da determinação de P_{OW} num laboratório. Resume-se a seguir o tratamento estatístico formal dos dados.

▼M4

Tratamento dos resultados

Demonstração de que se atingiu o equilíbrio

50. Calcula-se, para cada momento de colheita de amostras, o logaritmo da razão entre a concentração da substância em estudo em 1-octanol e em água [log (C_O/C_W)]. Comprova-se se o equilíbrio foi atingido representado graficamente essa razão em função do tempo. Se, nessa representação, for definido um patamar que abranja pelo menos quatro momentos consecutivos de colheita de amostras, o equilíbrio terá sido atingido e o composto estará verdadeiramente dissolvido no 1-octanol. Caso contrário, será necessário prosseguir o ensaio, até que quatro pontos consecutivos de colheita de amostras gerem um declive não significativamente diferente de zero, para p = 0,05, indicando assim que o parâmetro log (C_O/C_W) é independente do tempo.

Cálculo de log P_{OW}

51. O valor de log P_{OW} de cada unidade experimental corresponde ao valor médio ponderado de log (C_O/C_W) referente à parte da curva de log (C_O/C_W) em função do tempo na qual o equilíbrio foi comprovadamente atingido. Calcula-se essa média ponderando os dados com o inverso da variância, de modo que a influência dos dados no resultado final seja inversamente proporcional à incerteza dos mesmos.

Valor médio de log P_{OW}

52. O valor médio do log P_{OW} de várias unidades experimentais corresponde à média dos resultados dessas unidades, ponderados com a variância da unidade respetiva.

O cálculo a efetuar é o seguinte:

$$\log P_{OW,Av} = (\Sigma w_i \times \log P_{OW,i}) \times (\Sigma w_i)^{-1}$$

em que:

$\log P_{OW,i}$ = valor do log P_{OW} da unidade experimental i;

$\log P_{OW,Av}$ = valor médio ponderado das determinações de log P_{OW};

w_i = ponderação estatística do valor de log P_{OW} correspondente à unidade experimental i.

Como w_i utiliza-se o inverso da variância de log $P_{OW,i}$[$w_i = \text{var}(\log P_{OW,i})^{-1}$].

53. Como estimativa do erro do valor médio de log P_{OW} utiliza-se a repetibilidade do log (C_O/C_W) determinado para a fase de equilíbrio de cada unidade experimental. Exprime-se esse erro como o desvio-padrão ponderado de log $P_{OW,Av}$ ($\sigma_{\log Pow,Av}$), o qual mede o erro associado a log $P_{OW,Av}$. O desvio-padrão ponderado pode calcular-se do seguinte modo, a partir da variância ponderada

$$\text{var}_{\log Pow,Av} = (\Sigma w_i \times (\log P_{OW,i} - \log P_{OW,Av})^2) \times (\Sigma w_i \times (n-1))^{-1}$$

$$\sigma_{\log Pow,Av} = (\text{var}_{\log Pow,Av})^{0,5}$$

O símbolo "n" corresponde ao número de unidades experimentais.

▼M4

Relatório dos ensaios

54. Elementos a constar do relatório dos ensaios:

Substância em estudo:

— nome comum, denominação química, número CAS, fórmula estrutural (indicando a posição marcada marcada com isótopos radioativos, se for esse o caso) e propriedades físico-químicas pertinentes (ver o ponto 17),

— grau de pureza da substância (presença de impurezas),

— grau de pureza radioquímica da substância marcada e atividade molar (se for caso disso),

— estimativa preliminar de log P_{OW} e método de cálculo utilizado para determinar esse valor.

Condições de realização do ensaio:

— datas da realização dos estudos,

— temperatura durante os ensaios,

— volumes de 1-octanol e de água no início de cada ensaio,

— volumes das amostras de 1-octanol e de água colhidas,

— volumes de 1-octanol e de água que permanecem nos recipientes de ensaio,

— descrição dos recipientes de ensaio e das condições de agitação utilizados (geometria da barra de agitação e do recipiente de ensaio, altura do vórtice, em milímetros, e, quando conhecida, velocidade de agitação),

— métodos de análise utilizados para determinar a substância em estudo e limite de quantificação dos mesmos,

— cronologia das colheitas de amostras,

— pH da fase aquosa e tampões utilizados, quando se regula o pH devido à presença de moléculas ionizáveis,

— número de replicados.

Resultados:

— repetibilidade e sensibilidade dos métodos de análise utilizados,

— concentrações determinadas da substância em estudo no 1-octanol e na água, em função do tempo,

— balanço de massas,

— temperatura e desvio-padrão da temperatura, ou intervalo de temperaturas, durante o ensaio,

— gráfico da razão das concentrações em função do tempo,

— valor médio log $P_{OW,Av}$ e erro-padrão do mesmo,

— discussão e interpretação dos resultados,

▼M4

— exemplos de dados não tratados de análises representativas (os dados não tratados devem ser todos registados de acordo com as boas práticas de laboratório), incluindo recuperações de padrões paralelos, número de níveis de concentração utilizado na calibração (juntamente com os critérios do coeficiente de correlação da curva de calibração) e resultados de controlo/garantia de qualidade,

— caso exista: relatório da validação do protocolo experimental (a mencionar nas referências).

REFERÊNCIAS:

(1) De Bruijn J.H.M., Busser F., Seinen W., Hermens J. (1989). Determination of octanol/water partition coefficients with the "slow-stirring" method. *Environ. Toxicol. Chem.* 8:499-512.

(2) Capítulo A.8 deste anexo, "Coeficiente de partição".

(3) Capítulo A.8 deste anexo, "Coeficiente de partição".

(4) OCDE (2000). OECD Draft Guideline for the Testing of Chemicals: 122, Partition Coefficient (n-Octanol/Water): pH-Metric Method for Ionisable Substances. Paris.

(5) Tolls J. (2002). Partition Coefficient 1-Octanol/Water (Pow) Slow-Stirring Method for Highly Hydrophobic Chemicals, Validation Report. RIVM contract-Nrs 602730 M/602700/01.

(6) Boethling R.S., Mackay D. (eds.) (2000). Handbook of property estimation methods for chemicals. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA.

(7) Schwarzenbach R.P., Gschwend P.M., Imboden D.M. (1993). Environmental Organic Chemistry. Wiley, New York, NY.

(8) Arnold C.G., Widenhaupt A., David M.M., Müller S.R., Haderlein S.B., Schwarzenbach R.P. (1997). Aqueous speciation and 1-octanol-water partitioning of tributyl- and triphenyltin: effect of pH and ion composition. *Environ. Sci. Technol.* 31:2596-2602.

(9) OCDE (1981). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: 112, Dissociation Constants in Water. Paris.

(10) Capítulo A.6 deste anexo, "Solubilidade em água".

(11) Capítulo C.7 deste anexo, "Degradação – Degradação abiótica: Hidrólise em função do pH".

(12) Capítulo C.4, "Determinação da biodegradabilidade 'Fácil'", partes II a VII (métodos A a F), deste anexo.

(13) Capítulo A.4 deste anexo, "Pressão de vapor".

(14) Pinsuwan S., Li A., Yalkowsky S.H. (1995). Correlation of octanol/water solubility ratios and partition coefficients. *J. Chem. Eng. Data* 40:623-626.

(15) Lyman W.J. (1990). Solubility in water. *In*: Handbook of Chemical Property Estimation Methods: Environmental Behavior of Organic Compounds. Lyman W.J., Reehl W.F., Rosenblatt D.H. Eds. American Chemical Society, Washington, DC, 2-1 a 2-52.

(16) Leo A., Weininger D. (1989). Medchem Software Manual. Daylight Chemical Information Systems, Irvine, CA.

(17) Meylan W. (1993). SRC-LOGKOW for Windows. SRC, Syracuse, N.Y.

(18) Compudrug L. (1992). ProLogP. Compudrug, Ltd., Budapest.

(19) ACD. ACD logP. Advanced Chemistry Development, Toronto, Ontario M5H 3V9, Canada, 2001.

▼**M4**

(20) Lyman W.J. (1990). Octanol/water partition coefficient. *In* Lyman W.J., Reehl W.F., Rosenblatt D.H., eds., Handbook of chemical property estimation. American Chemical Society, Washington, D.C.

(21) Rekker R.F., de Kort H.M. (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set. *Eur. J. Med. Chem. Chim. Ther.* 14:479-488.

(22) Jübermann O. (1958). Houben-Weyl, ed., *Methoden der Organischen Chemie*: 386-390.

▼M4

Apêndice 1

Tabela para o cálculo do volume mínimo de água necessário para a deteção, em fases aquosas, de substâncias em estudo com diferentes valores de log P_{OW}

Pressupostos:

— Volume máximo de cada alíquota = 10 % do volume total; 5 alíquotas = 50 % do volume total.

— Concentração da substância em estudo = 0,7 × solubilidade em cada fase. Se a concentração for mais baixa, serão necessários volumes maiores.

— Volume utilizado para determinar o limite de deteção (LOD) = 100 ml.

— As relações log P_{OW} em função de log S_W e log P_{OW} em função de SR (solubilidade relativa, S_O/S_W) traduzem com razoabilidade relações evidenciadas pelas substâncias às quais o método se aplica.

Estimativa de S_W

log P_{OW}	Equação	log S_W	S_W (mg/l)
4	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	0,496	3,133E+00
4,5	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	0,035	1,084E+00
5	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	– 0,426	3,750E-01
5,5	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	– 0,887	1,297E-01
6	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	– 1,348	4,487E-02
6,5	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	– 1,809	1,552E-02
7	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	– 2,270	5,370E-03
7,5	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	– 2,731	1,858E-03
8	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	– 3,192	6,427E-04

Estimativa de S_O

log P_{OW}	Equação	S_O (mg/l)
4	$\log P_{ow} = 0{,}88 \log SR + 0{,}41$	3,763E+04
4,5	$\log P_{ow} = 0{,}88 \log SR + 0{,}42$	4,816E+04
5	$\log P_{ow} = 0{,}88 \log SR + 0{,}43$	6,165E+04
5,5	$\log P_{ow} = 0{,}88 \log SR + 0{,}44$	7,890E+04
6	$\log P_{ow} = 0{,}88 \log SR + 0{,}45$	1,010E+05
6,5	$\log P_{ow} = 0{,}88 \log SR + 0{,}46$	1,293E+05
7	$\log P_{ow} = 0{,}88 \log SR + 0{,}47$	1,654E+05
7,5	$\log P_{ow} = 0{,}88 \log SR + 0{,}48$	2,117E+05
8	$\log P_{ow} = 0{,}88 \log SR + 0{,}49$	2,710E+05

▼M4

Massa total da substância em estudo (mg)	$Massa_{octanol}/Massa_{água}$	$Massa_{água}$ (mg)	$Concentração_{água}$ (mg/l)	$Massa_{octanol}$ (mg)	$Concentração_{octanol}$ (mg/l)
1 319	526	2,5017	2,6333	1 317	26 333
1 686	1 664	1,0127	1,0660	1 685	33 709
2 158	5 263	0,4099	0,4315	2 157	43 149
2 762	16 644	0,1659	0,1747	2 762	55 230
3 535	52 632	0,0672	0,0707	3 535	70 691
4 524	1664 36	0,0272	0,0286	4 524	90 480
5 790	5263 16	0,0110	0,0116	5 790	115 807
7 411	1 664 357	0,0045	0,0047	7 411	148 223
9 486	5 263 158	0,0018	0,0019	9 486	189 713

Cálculo dos volumes

Volume mínimo da fase aquosa, em função do limite de deteção (LOD)

log K_{OW}	LOD (microgramas/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
4		0,04	0,38	3,80	38	380
4,5		0,09	0,94	9,38	94	938
5		0,23	2,32	23,18	232	2 318
5,5		0,57	5,73	57,26	573	5 726
6		1,41	14,15	141	1 415	14 146
6,5		3,50	34,95	350	3 495	34 950
7		8,64	86,35	864	8 635	86 351
7,5		21,33	213	2 133	21 335	213 346
8		52,71	527	5 271	52 711	527 111
Volume utilizado na determinação do LOD (l)	0,1					

Legenda

Representa menos de 10 % do volume total de fase aquosa, com um recipiente de equilíbrio de um litro.

Representa menos de 10 % do volume total de fase aquosa, com um recipiente de equilíbrio de dois litros.

Representa menos de 10 % do volume total de fase aquosa, com um recipiente de equilíbrio de cinco litros.

Representa menos de 10 % do volume total de fase aquosa, com um recipiente de equilíbrio de 10 litros.

Excede 10 % do volume até do recipiente de equilíbrio de 10 litros.

▼M4

Resumo dos volumes necessários, em função da hidrossolubilidade e do log P_{OW}

Volume mínimo (ml) da fase aquosa, em função do limite de deteção (LOD)

log P_{OW}	S_W (mg/l)	LOD (microgramas/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
4	10		0,01	0,12	1,19	11,90	118,99
	5		0,02	0,24	2,38	23,80	237,97
	3		0,04	0,40	3,97	39,66	396,62
	1		0,12	1,19	11,90	118,99	1 189,86
4,5	5		0,02	0,20	2,03	20,34	203,37
	2		0,05	0,51	5,08	50,84	508,42
	1		0,10	1,02	10,17	101,68	1 016,83
	0,5		0,20	2,03	20,34	203,37	2 033,67
5	1		0,09	0,87	8,69	86,90	869,01
	0,5		0,17	1,74	17,38	173,80	1 738,02
	0,375		0,23	2,32	23,18	231,75	2 317,53
	0,2		0,43	4,35	43,45	434,51	4 345,05
5,5	0,4		0,19	1,86	18,57	185,68	1 856,79
	0,2		0,37	3,71	37,14	371,36	3 713,59
	0,1		0,74	7,43	74,27	742,72	7 427,17
	0,05		1,49	14,85	148,54	1 485,43	14 854,35
6	0,1		0,63	6,35	63,48	634,80	6 347,95
	0,05		1,27	12,70	126,96	1 269,59	12 695,91
	0,025		2,54	25,39	253,92	2 539,18	25 391,82
	0,0125		5,08	50,78	507,84	5 078,36	50 783,64
6,5	0,025		2,17	21,70	217,02	2 170,25	21 702,46
	0,0125		4,34	43,40	434,05	4 340,49	43 404,93
	0,006		9,04	90,43	904,27	9 042,69	90 426,93
	0,003		18,09	180,85	1 808,54	18 085,39	180 853,86
7	0,006		7,73	77,29	772,89	7 728,85	77 288,50
	0,003		15,46	154,58	1 545,77	15 457,70	154 577,01
	0,0015		23,19	231,87	2 318,66	23 186,55	231 865,51
	0,001		46,37	463,73	4 637,31	46 373,10	463 731,03
7,5	0,002		19,82	198,18	1 981,77	19 817,73	198 177,33
	0,001		39,64	396,35	3 963,55	39 635,47	396 354,66
	0,0005		79,27	792,71	7 927,09	79 270,93	792 709,32

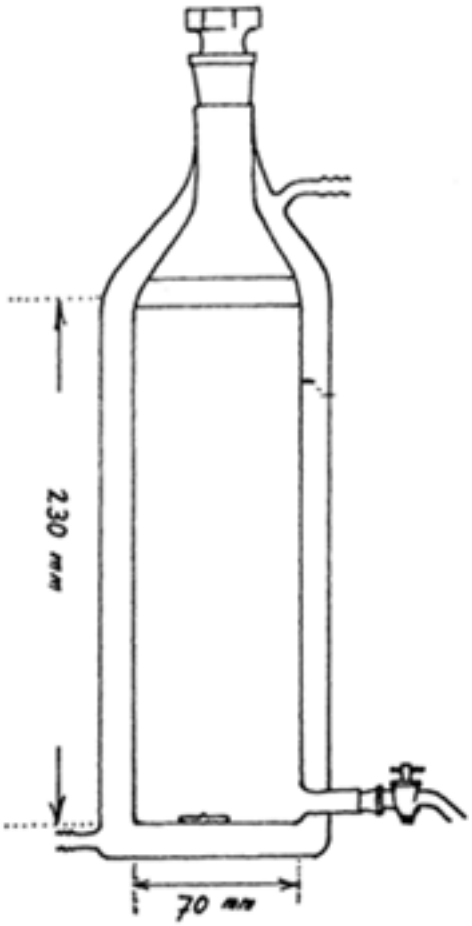
▼**M4**

log P_{OW}	S_W (mg/l)	LOD (microgramas/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
	0,00025		158,54	1 585,42	15 854,19	158 541,86	1 585 418,63
8	0,001		33,88	338,77	3 387,68	33 876,77	338 767,72
	0,0005		67,75	677,54	6 775,35	67 753,54	677 535,44
	0,00025		135,51	1 355,07	13 550,71	135 507,09	1 355 070,89
	0,000125		271,01	2 710,14	27 101,42	271 014,18	2 710 141,77
Volume utilizado na determinação do LOD (l)		0,1					

▼M4

Apêndice 2

Exemplo de recipiente com camisa de vidro para o ensaio com agitação lenta, para determinação do P_{OW}



▼M6

A.24. COEFICIENTE DE PARTIÇÃO (*N*-OCTANOL/ÁGUA): MÉTODO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)

INTRODUÇÃO

Este método é equivalente ao *Test Guideline* TG 117 (2004) da OCDE.

1. O coeficiente de partição (P) define-se como a razão entre as concentrações de equilíbrio de uma substância dissolvida num sistema de duas fases constituído por dois solventes claramente imiscíveis. No caso do *n*-octanol e da água,

$$P_{ow} = \frac{C_n - \text{octanol}}{C_{\text{água}}}$$

o coeficiente de partição é o quociente entre duas concentrações, adimensional e apresentado vulgarmente na forma do seu logaritmo de base 10.

2. P_{ow} é um parâmetro fundamental nos estudos do destino dos produtos químicos no ambiente. Está comprovada a existência de uma relação muito significativa entre o P_{ow} da forma não ionizada das substâncias e a bioacumulação dessas substâncias nos peixes. Foi igualmente demonstrado que o P_{ow} é um parâmetro útil na previsão da adsorção no solo e nos sedimentos e no estabelecimento de relações quantitativas estrutura-atividade para uma vasta gama de efeitos biológicos.

3. A proposta original do presente método de ensaio baseou-se num artigo da autoria de C.V. Eadsforth e P. Moser (1). O desenvolvimento do método de ensaio e a realização de um ensaio comparativo interlaboratorial organizado pela OCDE foram coordenados pelo *Umweltbundesamt* da República Federal da Alemanha em 1986 (2).

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

4. Os valores de log P_{ow} na gama de – 2 a 4 (ocasionalmente, 5 e mais) ([1]) podem ser determinados experimentalmente pelo método do frasco agitado (capítulo A.8 do presente anexo, *Test Guideline* TG 107 da OCDE). O método de HPLC abrange valores de log P_{ow} na gama de 0 a 6 (1) (2) (3) (4) (5). Pode exigir uma estimativa do P_{ow} para o estabelecimento de substâncias de referência adequadas e o apoio de quaisquer conclusões decorrentes dos dados produzidos no ensaio. Os métodos de cálculo são discutidos de forma sucinta no apêndice. A HPLC é executada em modo isocrático.

5. Os valores de P_{ow} dependem das condições operacionais (temperatura, pH, força iónica, etc.), condições essas que devem estar bem definidas, com vista à interpretação correta dos dados de P_{ow}. No respeitante às substâncias ionizáveis, pode tornar-se disponível outro método (por exemplo, projeto de orientações da OCDE para a determinação do pH de substâncias ionizadas (6)), passível de utilização como método alternativo. Embora o presente projeto de orientações da OCDE possa ser adequado à determinação dos P_{ow} dessas substâncias ionizáveis, em alguns casos é mais adequado utilizar o método de HPLC com um pH pertinente do ponto de vista ambiental (ver ponto 9).

([1]) O limite máximo deve-se à necessidade de garantir a completa separação das fases após o ajustamento do equilíbrio de partição e antes da colheita das amostras para as determinações analíticas. Se forem tomados os devidos cuidados, o limite máximo pode ser alargado a valores mais elevados de P_{ow}.

▼M6

PRINCÍPIO DO MÉTODO

6. A HPLC de fase reversa é aplicada em colunas analíticas com uma fase sólida comercialmente disponível que contenha hidrocarbonetos de cadeia longa (por exemplo, C8, C18) quimicamente ligados à sílica.

7. Os produtos químicos injetados em colunas desse tipo repartem-se entre a fase móvel do solvente e a fase estacionária de hidrocarbonetos, à medida que são arrastados pela fase móvel ao longo da coluna. As substâncias são retidas proporcionalmente ao seu coeficiente de partição hidrocarbonetos-água, sendo as substâncias hidrófilas eluídas primeiro e as substâncias lipófilas eluídas em último lugar. O tempo de retenção é descrito pelo fator de capacidade *k*, dado pela expressão:

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

em que t_R representa o tempo de retenção do produto químico em estudo e t_0 o tempo morto, ou seja, o tempo médio de que uma molécula de solvente necessita para atravessar a coluna. Não são necessários métodos analíticos quantitativos, sendo apenas necessária a determinação dos tempos de retenção.

8. O coeficiente de partição octanol/água de um produto químico em estudo pode ser calculado através da determinação experimental do seu fator de capacidade *k*, introduzido de seguida na seguinte equação:

$$\log P_{ow} = a + b \times \log k$$

em que

a, b = coeficientes de regressão linear.

A equação anterior pode ser obtida por regressão linear dos logaritmos dos coeficientes de partição octanol/água de substâncias de referência em função dos logaritmos dos fatores de capacidade das mesmas.

9. O método de HPLC de fase reversa permite estimar coeficientes de partição na gama de log P_{ow} compreendida entre 0 e 6, que, em casos excecionais, pode ser alargada à gama de log P_{ow} compreendida entre 6 e 10. Para tal, pode ser necessário alterar a fase móvel (3). O método não é aplicável a ácidos e bases fortes, a complexos de metais, a substâncias que reajam com o eluente ou a agentes tensioativos. Podem ser efetuadas determinações com substâncias ionizáveis na forma não ionizada (ácido livre ou base livre), apenas por recurso a um tampão adequado com pH inferior ao pK_a do ácido livre ou superior ao pK_a da base livre. Em alternativa, poderá disponibilizar-se o método de medição do pH para o ensaio de substâncias ionizáveis (6), para utilização como método alternativo (6). Se a determinação do valor de log P_{ow} tiver por objetivo a classificação em matéria de perigos para o ambiente ou a avaliação dos riscos para o ambiente, o ensaio deve ser executado no intervalo de pH pertinente para o meio natural, ou seja, na gama 5,0 - 9.

10. Em alguns casos, a presença de impurezas pode dificultar a interpretação dos resultados devido à incerteza na atribuição dos picos. No caso de misturas que produzam bandas não resolvidas, devem comunicar-se os limites inferiores de log P_{ow} e a percentagem da área correspondente a cada pico de log P_{ow}. No caso de misturas constituídas por um grupo de compostos homólogos, deve também ser referida a média ponderada do log P_{ow} (7), calculada com base nos diversos valores de P_{ow} e nos correspondentes valores percentuais de área (8). Para o cálculo (9) devem ser tomados em conta todos os picos que contribuam para uma área igual ou superior a 5 % da área total dos picos:

▼M6

$$\textit{média ponderada } \log P_{ow} = \frac{\sum_i (\log P_{owi})(\%\ \textit{área})}{\%\ \textit{área total dos picos}} = \frac{\sum (\textit{log } P_{owi})(\%_i\ \text{área})}{\sum_i \%\ \textit{área}}$$

A média ponderada do log P_{ow} é válida apenas para substâncias ou misturas (por exemplo, *tall oils*) constituídas por séries homólogas (por exemplo, séries de alcanos). As medições de misturas podem produzir resultados significativos, desde que o detetor tenha a mesma sensibilidade relativamente a todos os componentes da mistura e que estes possam ser resolvidos de forma adequada.

INFORMAÇÕES SOBRE A SUBSTÂNCIA EM ESTUDO

11. Antes da utilização do método, devem conhecer-se a fórmula estrutural, a constante de dissociação e a solubilidade na fase móvel. Além disso, são também úteis informações sobre a eventual hidrólise.

CRITÉRIOS DE QUALIDADE

12. Com vista a aumentar a confiança da medição, devem ser efetuadas determinações em duplicado.

— Repetibilidade: Os valores de log P_{ow} decorrentes de medições repetidas realizadas em condições idênticas e com o mesmo conjunto de substâncias de referência devem situar-se num intervalo de ± 0,1 unidades logarítmicas.

— Reprodutibilidade: Se as medições forem repetidas com um conjunto diferente de substâncias de referência, os resultados podem divergir. O coeficiente de correlação, R, entre log k e log P_{ow}, para um conjunto de substâncias em estudo, é geralmente da ordem de 0,9, o que corresponde a um coeficiente de partição octanol/água de log P_{ow} ± 0,5 unidades logarítmicas.

13. O ensaio comparativo interlaboratorial demonstrou que, quando se utiliza o método por HPLC, podem obter-se valores de log P_{ow} numa gama de ± 0,5 unidades relativamente aos obtidos pelo método do frasco agitado (2). As referências bibliográficas (4) (5) (10) (11) (12) apresentam outras comparações. Os gráficos de correlação baseados em substâncias de referência estruturalmente afins fornecem os resultados mais precisos (13).

SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

14. Para estabelecer uma correlação entre o fator *k* de capacidade de uma substância e o seu P_{ow}, é necessário traçar uma curva de calibração com, pelo menos, seis pontos (ver ponto 24). A seleção das substâncias de referência adequadas é deixada ao critério do utilizador. As substâncias de referência devem, em geral, apresentar valores de log P_{ow} que abranjam o log P_{ow} da substância em estudo, ou seja, pelo menos uma substância de referência deve apresentar um P_{ow} superior ao da substância em estudo, e outra um P_{ow} inferior. A extrapolação só deve ser utilizada em casos excecionais. É recomendável que as substâncias de referência sejam estruturalmente relacionadas com a substância em estudo. Os valores de log P_{ow} das substâncias de referência utilizadas para a calibração devem basear-se em dados experimentais fiáveis. Contudo, no caso de substâncias com log P_{ow} elevado (geralmente mais de 4), podem utilizar-se os valores calculados, salvo se existirem dados experimentais fiáveis. Se forem utilizados valores extrapolados, é necessário definir um valor-limite.

15. Existem listagens extensivas de valores de log P_{ow} para muitos grupos de compostos químicos (14) (15). Caso os dados sobre os coeficientes de partição das substâncias estruturalmente afins não se encontrem disponíveis, é possível recorrer a uma calibração mais geral por recurso a outras substâncias de referência. As substâncias de referência recomendadas, juntamente com os respetivos valores de P_{ow} constam do quadro 1. Quanto às substâncias ionizáveis, os valores indicados dizem respeito à forma não ionizada. Foi efetuada uma verificação da plausibilidade e da qualidade dos valores no contexto do ensaio de comparação interlaboratorial.

▼**M6**

Quadro 1

Substâncias de referência recomendadas

	Número CAS	Substância de referência	log P_{ow}	pKa
1	78-93-3	2-Butanona (metiletilcetona)	0,3	
2	1122-54-9	4-Acetilpiridina	0,5	
3	62-53-3	Anilina	0,9	
4	103-84-4	Acetanilida	1,0	
5	100-51-6	Álcool benzílico	1,1	
6	150-76-5	4-Metoxifenol	1,3	pKa = 10,26
7	122-59-8	Ácido fenoxiacético	1,4	pKa = 3,12
8	108-95-2	Fenol	1,5	pKa = 9,92
9	51-28-5	2,4-Dinitrofenol	1,5	pKa = 3,96
10	100-47-0	Benzonitrilo	1,6	
11	140-29-4	Fenilacetonitrilo	1,6	
12	589-18-4	Álcool 4-metilbenzílico	1,6	
13	98-86-2	Acetofenona	1,7	
14	88-75-5	2-Nitrofenol	1,8	pKa = 7,17
15	121-92-6	Ácido 3-nitrobenzóico	1,8	pKa = 3,47
16	106-47-8	4-Cloroanilina	1,8	pKa = 4,15
17	98-95-3	Nitrobenzeno	1,9	
18	104-54-1	Álcool cinamílico (álcool cinâmico)	1,9	
19	65-85-0	Ácido benzóico	1,9	pKa = 4,19
20	106-44-5	*p*-Cresol	1,9	pKa = 10,17
21	140-10-3 (*trans*)	Ácido cinâmico	2,1	pKa = 3,89 (*cis*) *4*,4 (*trans*)
22	100-66-3	Anisole	2,1	
23	93-58-3	Benzoato de metilo	2,1	
24	71-43-2	Benzeno	2,1	
25	99-04-7	Ácido metilbenzóico	2,4	pKa = 4,27
26	106-48-9	4-Clorofenol	2,4	pKa = 9,1
27	79-01-6	Tricloroetileno	2,4	
28	1912-24-9	Atrazina	2,6	
29	93-89-0	Benzoato de etilo	2,6	

▼**M6**

	Número CAS	Substância de referência	log P_{ow}	pKa
30	1194-65-6	2,6-Diclorobenzonitrilo	2,6	
31	535-80-8	Ácido 3-clorobenzóico	2,7	pKa = 3,82
32	108-88-3	Tolueno	2,7	
33	90-15-3	1-Naftol	2,7	pKa = 9,34
34	608-27-5	2,3-Dicloroanilina	2,8	
35	108-90-7	Clorobenzeno	2,8	
36	1746-13-0	Éter alilfenílico	2,9	
37	108-86-1	Bromobenzeno	3,0	
38	100-41-4	Etilbenzeno	3,2	
39	119-61-9	Benzofenona	3,2	
40	92-69-3	4-Fenilfenol	3,2	pKa = 9,54
41	89-83-8	Timol	3,3	
42	106-46-7	1,4-Diclorobenzeno	3,4	
43	122-39-4	Difenilamina	3,4	pKa = 0,79
44	91-20-3	Naftaleno	3,6	
45	93-99-2	Benzoato de fenilo	3,6	
46	98-82-8	Isopropilbenzeno	3,7	
47	88-06-2	2,4,6-Triclorofenol	3,7	pKa = 6
48	92-52-4	Bifenilo	4,0	
49	120-51-4	Benzoato de benzilo	4,0	
50	88-85-7	2,4-Dinitro-6-*sec*-butilfenol	4,1	
51	120-82-1	1,2,4-Triclorobenzeno	4,2	
52	143-07-7	Ácido dodecanóico	4,2	pKa = 5,3
53	101-84-8	Éter difenílico	4,2	
54	85-01-8	Fenantreno	4,5	
55	104-51-8	*n*-Butilbenzeno	4,6	
56	103-29-7	Dibenzilo	4,8	
57	3558-69-8	2,6-Difenilpiridina	4,9	
58	206-44-0	Fluoranteno	5,1	
59	603-34-9	Trifenilamina	5,7	
60	50-29-3	DDT	6,5	

▼M6

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Estimativa preliminar do coeficiente de partição

16. Se necessário, o coeficiente de partição da substância de ensaio pode ser estimado, preferencialmente por recurso a um método de cálculo (ver apêndice), ou, se for caso disso, com base na razão entre a solubilidade da substância de ensaio nos solventes puros.

Material e aparelhagem

17. É necessário um cromatógrafo de fase líquida equipado com uma bomba de pulsação baixa e um sistema de deteção adequado. Podem ser utilizados com uma grande variedade de grupos químicos um detetor de UV que utilize um comprimento de onda de 210 nm ou um detetor de IR. A presença de grupos polares na fase estacionária pode prejudicar gravemente os resultados da coluna de HPLC. Consequentemente, as fases estacionárias devem possuir uma percentagem mínima de grupos polares (16). Podem-se utilizar enchimentos de fase reversa de micropartículas disponíveis comercialmente ou colunas pré-enchidas. Pode-se interpor uma coluna de proteção entre o sistema de injeção e a coluna analítica.

Fase móvel

18. Para a preparação do solvente de eluição, que é desgaseificado antes da utilização, utilizam-se metanol para HPLC e água destilada ou desionizada. A eluição deve ser isocrática. Devem utilizar-se razões metanol/água com um teor mínimo de água de 25 %. Normalmente, uma proporção de 3:1 (v/v) na mistura metanol/água é satisfatória para a eluição de substâncias de log P igual a 6 ao fim de uma hora, com um caudal de 1 ml/minuto. No caso de substâncias com log P superior a 6, pode ser necessário reduzir o tempo de eluição (inclusive dos compostos de referência), diminuindo a polaridade da fase móvel ou o comprimento da coluna.

19. A substância em estudo e as substâncias de referência devem ser solúveis na fase móvel em concentrações suficientes para permitir as suas deteções. Apenas em casos excecionais podem ser utilizados aditivos com a mistura de metanol/água, uma vez que modificam as propriedades da coluna. Nesses casos, importa confirmar que os tempos de retenção das substâncias em estudo e de referência não são influenciados. Se a mistura metanol/água não for adequada, podem utilizar-se outras misturas de solventes orgânicos com água, como, por exemplo, etanol-água, acetonitrilo-água ou álcool isopropílico (2-propanol)-água.

20. O pH do eluente constitui um parâmetro crítico para as substâncias ionizáveis. Deve estar compreendido na gama de pH de funcionamento da coluna, normalmente entre 2 e 8. Recomenda-se a utilização de uma mistura-tampão. É necessário tomar precauções para evitar a precipitação de sais e a deterioração da coluna, cuja ocorrência é possível com algumas misturas fase orgânica/tampão. Em geral, não são aconselháveis determinações por HPLC com fases estacionárias à base de sílica para valores de pH superiores a 8, dado que a utilização de uma fase móvel alcalina pode causar uma deterioração rápida do desempenho da coluna.

Solutos

21. As substâncias de ensaio e de referência devem ser suficientemente puras para permitir a atribuição dos picos dos cromatogramas às respetivas substâncias. As substâncias a utilizar para efeitos de ensaio ou calibração são dissolvidas na fase móvel, se possível. Se, para dissolver as substâncias de ensaio e de referência, se recorrer a um solvente que não seja a fase móvel, esta deve ser utilizada para a diluição final antes da injeção.

Condições de realização dos ensaios

22. Durante as medições, a temperatura não deve variar mais de ± 1 °C.

▼M6

Determinação do tempo morto (t_o)

23. O tempo morto (t_0) pode ser determinado por recurso a substâncias orgânicas não retidas (por exemplo, tioureia ou formamida). É possível obter um tempo morto mais preciso a partir dos tempos de retenção medidos ou de um conjunto de cerca de sete membros de uma série homóloga (por exemplo, *n*-alquilmetilcetonas) (17). Os tempos de retenção t_R (n_C + 1) são representados em função de t_R (n_C), sendo n_C o número de átomos de carbono. Obtém-se uma linha reta, t_R (n_C + 1) = A t_R (n_C) + (1 – A)t_0; o parâmetro A, que representa $k(n_C + 1)/k(n_C)$, é constante. O tempo morto, t_0, obtém-se a partir da ordenada na origem (1 – A)t_0 e do declive A.

Equação de regressão

24. A etapa seguinte consiste em traçar uma curva de correlação de log k em função de log P para substâncias de referência apropriadas com valores de log P próximos do valor esperado para o produto químico em estudo. Na prática, são injetadas em simultâneo 6 a 10 substâncias de referência. Determinam-se os tempos de retenção, utilizando preferencialmente um integrador de registo ligado ao sistema de deteção. Os logaritmos correspondentes dos fatores de capacidade, log k, são representados graficamente em função de log P. A equação de regressão é aplicada a intervalos regulares, pelo menos uma vez por dia, de forma a poder ter em conta possíveis variações no desempenho da coluna.

DETERMINAÇÃO DO P_{OW} DO PRODUTO QUÍMICO EM ESTUDO

25. O produto químico em estudo é injetado na menor quantidade detetável. Determina-se o tempo de retenção em duplicado. O coeficiente de partição do produto é obtido por interpolação do fator de capacidade calculado na curva de calibração. Para coeficientes de partição muito baixos ou muito elevados, é necessária uma extrapolação. Nestes casos, em particular, deve prestar-se especial atenção aos intervalos de confiança da curva de regressão. Se o tempo de retenção da amostra estiver fora da gama de tempos de retenção obtidos para as substâncias de referência, é necessário definir um valor-limite.

DADOS E RELATÓRIOS

Relatório do ensaio

26. O relatório deve obrigatoriamente incluir os seguintes elementos:

— valores estimados e método utilizado, caso tenha sido efetuada a estimativa preliminar do coeficiente de partição; se foi utilizado um método de cálculo, apresentar a respetiva descrição completa, incluindo a identificação da base de dados e informações pormenorizadas sobre a escolha dos fragmentos;

— substância em estudo e substâncias de referência: grau de pureza, fórmula de estrutura e número CAS;

— descrição do equipamento e das condições de funcionamento: coluna analítica, coluna de proteção;

— fase móvel, meios de deteção, gama de temperaturas, pH;

— perfis de eluição (cromatogramas);

— tempo morto e respetivo método de medição;

— dados de retenção e valores de log P_{ow} encontrados nas referências bibliográficas para as substâncias de referência utilizadas na calibração;

— pormenores sobre a curva de regressão ajustada (log k em função de log P_{ow}) e o coeficiente de correlação da mesma, incluindo intervalos de confiança;

▼**M6**

— dados de retenção média e valor de log P_{ow} interpolado para o produto químico em estudo;

— no caso de misturas: cromatograma com o perfil de eluição, indicando a suspensão desta;

— valores de log P_{ow} relativos à percentagem da área do pico correspondente a log P_{ow};

— cálculo por recurso a curva de regressão;

— média ponderada dos valores de log P_{ow} calculados, se pertinente.

REFERÊNCIAS

(1) C.V. Eadsforth & P. Moser. (1983). Assessment of Reverse Phase Chromatographic Methods for Determining Partition Coefficients. Chemosphere. 12, 1459.

(2) W. Klein, W. Kördel, M. Weiss & H.J. Poremski. (1988). Updating of the OECD Test Guideline 107 Partition Coefficient n-Octanol-Water, OECD Laboratory Intercomparison Test on the HPLC Method. Chemosphere. 17, 361.

(3) C.V. Eadsforth. (1986). Application of Reverse H.P.L.C. for the Determination of Partition Coefficient. Pesticide Science. 17, 311.

(4) H. Ellgehausen, C. D'Hondt & R. Fuerer (1981). Reversed-phase chromatography as a general method for determining octan-1-ol/water partition coefficients. Pesticide. Science. 12, 219.

(5) B. McDuffie (1981). Estimation of Octanol Water Partition Coefficients for Organic Pollutants Using Reverse Phase High Pressure Liquid Chromatography. Chemosphere. 10, 73.

(6) OCDE (2000). Guideline for Testing of Chemicals — Partition Coefficient (n-octanol/water): pH-metric Method for Ionisable Substances. Projeto de diretriz, novembro de 2000.

(7) OSPAR (1995). «Harmonised Offshore Chemicals Notification Format (HOCFN) 1995», Oslo and Paris Conventions for the Prevention of Marine Pollution Programmes and Measures Committee (PRAM), Annex 10, Oviedo, 20–24 de fevereiro de 1995.

(8) M. Thatcher, M. Robinson, L. R. Henriquez & C. C. Karman. (1999). An User Guide for the Evaluation of Chemicals Used and Discharged Offshore, A CIN Revised CHARM III Report 1999. Version 1.0, 3 de agosto.

(9) E. A. Vik, S. Bakke & K. Bansal. (1998). Partitioning of Chemicals. Important Factors in Exposure Assessment of Offshore Discharges. Environmental Modelling & Software Vol. 13, pp. 529-537.

(10) L.O. Renberg, S.G. Sundstroem & K. Sundh-Nygård. (1980). Partition coefficients of organic chemicals derived from reversed-phase thin-layer chromatography. Evaluation of methods and application on phosphate esters, polychlorinated paraffins and some PCB-substitutes. Chemosphere. 9, 683.

(11) W.E. Hammers, G.J.Meurs & C.L. De-Ligny. (1982). Correlations between liquid chromatographic capacity ratio data on Lichrosorb RP-18 and partition coefficients in the octanol-water system. J. Chromatography 247, 1.

(12) J.E. Haky & A.M. Young. (1984). Evaluation of a simple HPLC correlation method for the estimation of the octanol-water partition coefficients of organic compounds. J. Liq. Chromatography. 7, 675.

(13) S. Fujisawa & E. Masuhara. (1981). Determination of Partition Coefficients of Acrylates Methacrylates and Vinyl Monomers Using High Performance Liquid Chromatography. Journal of Biomedical Materials Research. 15, 787.

▼**M6**

(14) C. Hansch & A. J. Leo. (1979). Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology. John Willey, New York.

(15) C. Hansch, chairman; A.J. Leo, dir. (1982). Log P and Parameter Database: A tool for the quantitative prediction of bioactivity — Available from Pomona College Medical Chemistry Project, Pomona College, Claremont, California 91711.

(16) R. F. Rekker, H. M. de Kort. (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set. Eur. J. Med. Chem. — Chim. Ther. 14, 479.

(17) G. E. Berendsen, P. J. Schoenmakers, L. de Galan, G. Vigh, Z. Varga-Puchony, & J. Inczédy. (1980). On determination of hold-up time in reversed-phase liquid chromatography. J. Liq. Chromato. 3, 1669.

▼M6

Apêndice

Métodos de cálculo de P_{OW}

INTRODUÇÃO

1. O presente apêndice apresenta uma breve introdução ao cálculo do P_{ow}. Para mais informações, remete-se o leitor para as obras de referência (1) (2).

2. Os valores calculados de P_{ow} são utilizados para os seguintes fins:

   — decidir qual o método experimental a utilizar: método do frasco agitado, para valores de log P_{ow} compreendidos entre –2 e 4, e método por HPLC, para valores de log P_{ow} compreendidos entre 0 e 6;

   — selecionar as condições de execução da HPLC (substâncias de referência, proporção metanol/água);

   — averiguar a plausibilidade dos valores obtidos por métodos experimentais;

   — obter uma estimativa quando não puderem ser aplicados métodos experimentais.

Princípio dos métodos de cálculo

3. Todos os métodos de cálculo sugeridos se baseiam na fragmentação teórica da molécula em substruturas adequadas relativamente às quais sejam conhecidos valores fiáveis dos incrementos de log P_{ow}. O log P_{ow} é obtido através da soma dos valores correspondentes aos fragmentos com os termos de correção para ter em conta as interações intramoleculares. Existem listas de constantes de fragmentos e de termos de correção (1) (2) (3) (4) (5) (6). Algumas são atualizadas regularmente (3).

Fiabilidade dos valores calculados

4. Em geral, a fiabilidade dos métodos de cálculo diminui à medida que a complexidade da substância em estudo aumenta. No caso de moléculas simples com baixo peso molecular e um ou dois grupos funcionais, é admissível um desvio de 0,1 a 0,3 unidades de log P_{ow} entre os resultados obtidos com os diversos métodos de fragmentação e os valores medidos. A margem de erro depende da fiabilidade das constantes dos fragmentos utilizadas, da capacidade para identificar interações intramoleculares (por exemplo, ligações de hidrogénio) e da utilização correta dos termos de correção. No caso de substâncias ionizantes, devem ser tidos em conta a carga e o grau de ionização (10).

Método π de Fujita-Hansch

5. A constante do substituinte hidrófobo (π), introduzida por Fujita et al. (7), define-se do seguinte modo:

$$^{\pi}X = \log P_{ow}\ (PhX) - \log P_{ow}\ (PhH)$$

em que PhX é um derivado aromático e PhH a substância parental.

$$\text{por exemplo, } {}^{\pi}Cl = \log Pow\ (C_6H_5Cl) - \log P_{ow}\ (C_6H_6)$$
$$= 2{,}84 - 2{,}13$$
$$= 0{,}71$$

O método π tem especial interesse no caso de substâncias aromáticas. Encontram-se disponíveis valores π para um grande número de substituintes (4) (5).

Método de Rekker

6. No método de Rekker (8), o valor de log P_{ow} é calculado do seguinte modo:

$$Log\ P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_j (\text{termos de intera\char "e7\char "e3o})$$

▼M6

em que a_i representa o número de vezes que um dado fragmento ocorre na molécula e f_i o incremento de log P_{ow} do fragmento. Os termos de interação podem ser expressos na forma de um integral múltiplo de uma única constante C_m (designada por «constante mágica»). As constantes dos fragmentos f_i e C_m foram determinadas a partir de uma listagem de 1 054 valores experimentais de P_{ow} (correspondentes a 825 substâncias), utilizando análise de regressão múltipla (6) (8). A determinação dos termos de interação efetua-se de acordo com regras definidas (6) (8) (9).

Método de Hansch-Leo

7. No método de Hansch e Leo (4), o valor de log P_{ow} é calculado do seguinte modo:

$$\text{Log } P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_j b_j F_j$$

em que f_i é uma constante de fragmento, F_j um termo (fator) de correção, a_i e b_j a frequência de ocorrência correspondente. As listagens de valores fragmentais correspondentes a átomos ou grupos F_j foram obtidas por «tentativa e erro» a partir dos valores experimentais de P_{ow}. Os termos de correção foram divididos em diversas classes diferentes (1) (4). Foram desenvolvidos conjuntos de *sofware* para ter em conta todas as regras e termos de correção (3).

MÉTODO COMBINADO

8. O cálculo dos valores log P_{ow} de moléculas complexas pode ser consideravelmente aperfeiçoado se a molécula for cindida em substruturas para as quais se encontrem disponíveis valores fiáveis de log P_{ow}, tanto a partir de tabelas (3) (4) como de medições. Esses fragmentos (por exemplo, heterociclos, antraquinona, azobenzeno) podem posteriormente ser combinados com os valores π de Hansch ou com as constantes dos fragmentos de Rekker ou Leo.

Observações

i) Os métodos de cálculo apenas são aplicáveis a substâncias parcial ou totalmente ionizadas se forem tidos em conta os fatores de correção necessários.

ii) Caso se presuma a existência de ligações intramoleculares entre átomos de hidrogénio, é necessário adicionar os termos de correção correspondentes (aproximadamente +0,6 a +1,0 unidades de log P_{ow}) (1). Podem obter-se indicações da presença dessas ligações a partir de modelos espaciais ou de dados espetroscópicos.

iii) Se forem possíveis diversas formas tautoméricas, deve utilizar-se a forma mais provável como base de cálculo;

(iv) As revisões das listagens de constantes de fragmentos devem ser seguidas de perto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS PARA OS MÉTODOS DE CÁLCULO

(1) W. J. Lyman, W. F. Reehl & D. H. Rosenblatt (ed.). Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill, New York (1982).

(2) W. J. Dunn, J. H. Block & R. S. Pearlman (ed.). Partition Coefficient, Determination and Estimation, Pergamon Press, Elmsford (New York) and Oxford (1986).

(3) Pomona College, Medicinal Chemistry Project, Claremont, California 91711, USA, Log P Database and Med. Chem. Software (Program CLOGP-3).

(4) C. Hansch & A. J. Leo. Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, New York (1979).

▼**M6**

(5) Leo, C. Hansch & D. Elkins. (1971) Partition coefficients and their uses. *Chemical. Reviews*. 71, 525.

(6) R. F. Rekker, H. M. de Kort. (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set. *Eur. J. Med. Chem*. — *Chim. Ther.* 14, 479.

(7) Toshio Fujita, Junkichi Iwasa & Corwin Hansch (1964). A New Substituent Constant, π, *J. Amer. Chem. Soc*. 86, 5175.

(8) R. F. Rekker. The Hydrophobic Fragmental Constant, Pharmacochemistry Library, Vol. 1, Elsevier, New York (1977).

(9) C.V. Eadsforth & P. Moser. (1983). Assessment of Reverse Phase Chromatographic Methods for Determining Partition Coefficients. *Chemosphere.* 12, 1459.

(10) R. A. Scherrer. ACS — Symposium Series 255, p. 225, American Chemical Society, Washington, D.C. (1984).

▼M7

A.25 CONSTANTES DE DISSOCIAÇÃO EM ÁGUA (MÉTODO DE TITULAÇÃO — MÉTODO ESPETROFOTOMÉTRICO — MÉTODO CONDUTIMÉTRICO)

INTRODUÇÃO

Este método de ensaio é equivalente ao *Test Guideline* 112 (1981) da OCDE.

Pré-requisitos

— Método analítico adequado

— Solubilidade em água

Dados para orientação

— Fórmula estrutural

— Condutividade elétrica (método condutimétrico)

Condições de admissibilidade

— Todos os métodos de ensaio podem ser executados com substâncias puras ou comerciais. Devem ser tidos em conta os possíveis efeitos de impurezas nos resultados.

— O método por titulação não é adequado para substâncias de baixa solubilidade (ver infra, «soluções de ensaio»).

— O método espetrofotométrico só é aplicável a substâncias cujas formas dissociada e não dissociada têm espetros de absorção UV/VIS apreciavelmente diferentes. Pode também ser adequado para substâncias com baixa solubilidade e para substâncias dissociativas que não sejam ácidas nem básicas (p. ex., formação de complexos).

— Nos casos que obedecem à equação de Onsager, pode utilizar-se um método condutimétrico, mesmo em concentrações relativamente baixas e em casos nos quais não exista um equilíbrio ácido/base.

Documentos normalizados

O presente método baseia-se nos métodos indicados nas referências incluídas na respetiva secção e no *Preliminary Draft Guidance for Premanufacture Notification* da EPA, de 18 de agosto de 1978.

MÉTODO — INTRODUÇÃO, FINALIDADE, ÂMBITO, PERTINÊNCIA, APLICAÇÃO E LIMITES DO ENSAIO

A dissociação de uma substância na água é importante para avaliar o seu impacto no ambiente. Determina a forma da substância, que, por sua vez, determina o seu comportamento e o seu transporte. Pode afetar a absorção da substância nos solos e nos sedimentos, bem como nas células biológicas.

Definições e unidades

Dissociação é a divisão reversível em duas ou mais espécies químicas, que podem ser iónicas. O processo, em termos gerais, é expresso pela equação

$$RX \rightleftharpoons R^{+} + X^{-}$$

A constante de equilíbrio que rege a reação, expressa em função da concentração, é dada por

$$K = \frac{[R^{+}][X^{-}]}{[RX]}$$

Por exemplo, no caso particular em que R é o hidrogénio (substância ácida), a constante é

▼M7

$$K_\alpha = [H^+] \cdot \frac{[X^-]}{[HX]}$$

ou

$$pK_\alpha = pH - \log\frac{[X^-]}{[HX]}$$

Substâncias de referência

Quando se investiga uma substância nova, não é necessário utilizar em todos os casos as substâncias de referência que se seguem. Referem-se, principalmente, para executar com regularidade a calibração do método, bem como para possibilitar a comparação dos resultados se se aplicar outro método.

	pK_a [1]	Temp. em °C
p-Nitrofenol	7,15	251
Ácido benzoico	4,12	20
p-Cloroanilina	3,93	20

[1] Não se dispõe de nenhum valor a 20 °C, mas pode presumir-se que a variabilidade dos resultados de medição é superior à dependência previsível da temperatura

Seria útil dispor de uma substância com vários pKs, conforme se referirá na descrição do princípio do método. Uma substância desse tipo pode ser, por exemplo:

Ácido cítrico	pK_a (8)	Temp. em °C
	1) 3,14	20
	2) 4,77	20
	3) 6,39	20

Princípio do método de ensaio

Em termos gerais, o processo descrito depende apenas ligeiramente da temperatura, na gama de temperaturas relevantes do ponto de vista ambiental. A determinação da constante de dissociação exige a medição das concentrações das formas dissociada e não dissociada do produto químico. A constante pode ser determinada com base na estequiometria da reação de dissociação indicada em «Definições e unidades» No caso específico descrito no presente método de ensaio, a substância comporta-se como ácido ou como base, sendo a determinação feita, de forma mais prática, pela determinação das concentrações relativas das formas ionizada e não ionizada da substância e do pH da solução. A relação entre estes termos é dada pela equação que define o pK_a, na secção «Definições e unidades» Algumas substâncias apresentam várias constantes de dissociação, para as quais se podem estabelecer equações semelhantes. Alguns dos métodos a seguir descritos são também adequados para processos de dissociação que não envolvam ácidos nem bases.

Critérios de qualidade

Repetibilidade

A constante de dissociação deve ser reprodutível com uma aproximação a ± 0,1 unidades logarítmicas (no mínimo, três determinações).

DESCRIÇÃO DO PROTOCOLO DE ENSAIO

Podem adotar-se duas abordagens básicas para a determinação do pK_a. Uma delas consiste na titulação de uma determinada quantidade de substância com um padrão ácido ou básico, consoante o caso; a outra consiste em determinar a concentração relativa das formas ionizada e não ionizada e a sua dependência do pH.

▼M7

Preparações

Os métodos baseados nos referidos princípios compreendem processos de titulação, espetrofotométricos e condutimétricos.

Soluções utilizadas no ensaio

Nos métodos de titulação e condutimétrico, o produto químico deve ser dissolvido em água destilada. No caso da espetrofotometria e de outros métodos, utilizam-se soluções-tampão. A concentração da substância em estudo não pode exceder 0,01 M ou metade da concentração de saturação (prevalecendo o menor destes valores), devendo utilizar-se uma substância com a maior pureza possível para completar as soluções. Se a substância for moderadamente solúvel, pode ser dissolvida numa pequena quantidade de solvente miscível em água antes de ser adicionada nas concentrações atrás indicadas.

Deve averiguar-se a presença de emulsões nas soluções por recurso a um feixe de filtração, em especial se se utilizar um cossolvente para reforçar a solubilidade. Se se utilizarem soluções-tampão, a concentração do tampão não pode exceder 0,05 M.

Condições de realização do ensaio

Temperatura

A temperatura deve ser mantida num intervalo máximo de ± 1 °C. A determinação deve ser efetuada, de preferência, à temperatura de 20 °C.

Caso se preveja que os resultados dependam da temperatura, a determinação deve ser efetuada a, pelo menos, duas outras temperaturas de ensaio. Nestas condições, os intervalos de temperatura devem ser de 10 °C e a temperatura deve ser mantida a ± 0,1 °C.

Análises

O método será determinado pela natureza da substância que se pretende ensaiar. Deve ser suficientemente sensível para permitir a determinação das diferentes espécies em cada concentração de ensaio.

Realização do ensaio

Método de titulação

A solução de ensaio é titulada com a solução-padrão de ácido ou de base, consoante o caso, medindo-se o pH após cada adição de titulante. Devem efetuar-se, pelo menos, 10 adições antes de ser atingido o ponto de equivalência. Se o equilíbrio for atingido com rapidez suficiente, pode utilizar-se um potenciómetro registador. Neste método, tanto a quantidade total como a concentração da substância têm de ser conhecidas com rigor. Devem ser tomadas precauções para evitar a interferência de dióxido de carbono. Os ensaios de referência (p. ex., referências (1), (2), (3) e (4)) contêm pormenores sobre o procedimento, as precauções a tomar e os cálculos.

Método espetrofotométrico

Determina-se o comprimento de onda ao qual as formas ionizada e não ionizada da substância têm coeficientes de extinção consideravelmente diferentes. Obtém-se o espetro de absorção no UV/VIS de soluções de concentração constante, em função do pH, para substâncias essencialmente não ionizadas e totalmente ionizadas, a vários pH intermédios. Para tal, pode proceder-se à adição de porções de ácido ou base concentrados a um volume relativamente grande de uma solução da substância num tampão multicomponentes, a um pH inicialmente alto ou baixo (ref. 5), ou à adição de volumes iguais de uma solução de reserva da substância (p. ex., em água ou metanol) a volumes constantes de diversas soluções-tampão que abranjam o intervalo de pH pretendido. A partir dos valores de pH e de absorvância no comprimento de onda selecionado, calcula-se um número suficiente de valores de pK_a utilizando dados a, pelo menos, cinco pH, se a substância for ionizada a, pelo menos, 10 % e a menos de 90 %. A referência (1) apresenta dados experimentais complementares e o método de cálculo.

▼M7

Método condutimétrico

Utilizando uma célula de constante conhecida (baixa), mede-se a condutividade de uma solução aproximadamente 0,1 M da substância em água condutora. Medem-se também as condutividades de uma série de diluições rigorosas da solução. Reduz-se a concentração para metade em cada ensaio, devendo a série abranger, pelo menos, uma ordem de grandeza de concentração. Determina-se a condutividade-limite a uma diluição infinita, realizando um ensaio similar com o sal sódico e extrapolando. O grau de dissociação pode ser calculado a partir da condutividade de cada solução, utilizando a equação de Onsager; a constante de dissociação pode ser calculada por recurso à lei da diluição de Ostwald, de acordo com a equação $K = \alpha^2C/(1 - \alpha$, em que C é a concentração, em moles por litro, e α a fração dissociada. Devem tomar-se precauções para evitar a interferência de CO_2. Os textos normalizados e as referências (1), (6) e (7) apresentam dados experimentais complementares, assim como o método de cálculo.

RESULTADOS E RELATÓRIO

Tratamento dos resultados

Método de titulação

Calcula-se o pK_a para 10 pontos medidos na curva de titulação. Calculam-se a média e o desvio-padrão dos valores de pK_a. Juntamente com a apresentação na forma de quadro, deve fornecer-se uma representação gráfica do pH em função do volume da base-padrão ou do ácido-padrão.

Métodos espetrofotométricos

Tabulam-se a absorvância e o pH relativamente a cada espetro. Calculam-se, pelo menos, cinco valores de pK_a a partir dos dados espetrais intermédios, calculando-se também a média e o desvio-padrão dos resultados.

Método condutimétrico

A condutividade equivalente, Λ, é calculada para cada concentração de ácido e para cada concentração de uma mistura de um equivalente de ácido e 0,98 equivalentes de hidróxido de sódio isento de carbonatos. Utiliza-se ácido em excesso a fim de evitar um excesso de iões OH^- devido à ocorrência de hidrólise. Representa-se graficamente $1/\Lambda$ em função de Ö_C; o valor Λ_o do sal pode ser determinado por extrapolação à concentração zero.

O valor Λ_o do ácido pode ser calculado utilizando os valores referidos na bibliografia para H^+ e Na^+. O pK_a pode ser calculado com base nas equações $\alpha = \Lambda_i /\Lambda_o$ e $K_a = \alpha^2C/(1 - \alpha)$, para cada concentração. Podem obter-se valores mais rigorosos de K_a aplicando correções relativas à mobilidade e à atividade. Devem calcular-se a média e o desvio-padrão dos valores de pK_a.

Relatório de ensaio

Devem apresentar-se todos os dados em bruto e os valores calculados de pK_a, juntamente com o método de cálculo (de preferência em forma de quadro, como sugerido na ref. 1), assim como os parâmetros estatísticos acima descritos. No respeitante aos métodos por titulação, devem fornecer-se pormenores sobre a normalização dos titulantes.

No respeitante ao método espetrofotométrico, devem apresentar-se todos os espetros. No respeitante ao método condutimétrico, deve especificar-se o modo de determinação da constante da célula. Devem também fornecer-se informações sobre a técnica utilizada, os métodos analíticos e a natureza dos eventuais tampões utilizados.

Devem ainda comunicar-se as temperaturas de ensaio.

REFERÊNCIAS

1) Albert, A. & Sergeant, E.P.: *Ionization Constants of Acids and Bases,* Wiley, Inc., New York, 1962.

▼**M7**

2) Nelson, N.H. & Faust, S.D.: Acidic dissociation constants of selected aquatic herbicides, Env. Sci. Tech. 3, II, pp. 1186-1188 (1969).

3) ASTM D 1293 — Annual ASTM Standards, Philadelphia, 1974.

4) Standard Method 242. APHA/AWWA/WPCF, *Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water*, 14th Edition, American Public Health Association, Washington, D.C., 1976.

5) Clark, J. & Cunliffe, A.E.: Rapid spectrophotometric measurement of ionisation constants in aqueous solution. Chem. Ind. (London) 281, (março de 1973).

6) ASTM D 1125 — Annual ASTM Standards, Philadelphia, 1974.

7) Standard Method 205 — APHA/AWWA/NPCF [ver (4) acima].

8) *Handbook of Chemistry and Physics,* 60th ed. CRC-Press, Boca Raton, Florida, 33431 (1980).

▼B

PARTE B: MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DA TOXICIDADE E DE OUTROS EFEITOS NA SAÚDE

ÍNDICE

INTRODUÇÃO GERAL

B.1.bis. TOXICIDADE ORAL AGUDA — PROCEDIMENTO DE DOSE FIXA

B.1.tris. TOXICIDADE ORAL AGUDA — MÉTODO DE CLASSIFICAÇÃO DE TOXICIDADE AGUDA

B.2. TOXICIDADE AGUDA POR INALAÇÃO

B.3. TOXICIDADE AGUDA (DÉRMICA)

B.4. TOXICIDADE AGUDA: IRRITAÇÃO/CORROSÃO DÉRMICA

B.5. IRRITAÇÃO/CORROSÃO OCULAR AGUDAS

B.6. SENSIBILIZAÇÃO CUTÂNEA

B.7. ESTUDO DA TOXICIDADE ORAL POR DOSE REPETIDA DURANTE 28 DIAS EM ROEDORES

B.8. TOXICIDADE SUBAGUDA POR INALAÇÃO: ESTUDO DE 28 DIAS

B.9. TOXICIDADE (DÉRMICA) DA DOSE REPETIDA (28 DIAS)

B.10. ENSAIO *IN VITRO* DE ABERRAÇÕES CROMOSSÓMICAS EM MAMÍFEROS

B.11. ENSAIO DE ABERRAÇÕES CROMOSSÓMICAS EM CÉLULAS DA MEDULA DE MAMÍFEROS

B.12. ENSAIO DE MICRONÚCLEOS EM ERITRÓCITOS DE MAMÍFEROS

B.13/14. MUTAGENICIDADE — ENSAIO DE MUTAÇÃO REVERSA EM BACTÉRIAS

B.17. ENSAIO *IN VITRO* DE MUTAÇÃO GÉNICA EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS UTILIZANDO OS GENES HPRT E XPRT

B.21. TESTES DE TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS DE MAMÍFERO *IN VITRO*

B.22. ENSAIO DE LETALIDADE DOMINANTE NO ROEDOR

▼B

B.23. ENSAIO DE ABERRAÇÕES CROMOSSÓMICAS EM ESPERMATOGÓNIAS DE MAMÍFERO

B.25. TRANSLOCAÇÃO HEREDITÁRIA NO RATINHO

B.26. ENSAIO DE TOXICIDADE ORAL SUBCRÓNICA ESTUDO DE TOXICIDADE ORAL DE DOSE REPETIDA EM ROEDORES COM A DURAÇÃO DE 90 DIAS

B.27. ENSAIO DE TOXICIDADE ORAL SUBCRÓNICA ESTUDO DE TOXICIDADE ORAL DE DOSE REPETIDA EM ESPÉCIES NÃO ROEDORAS COM A DURAÇÃO DE 90 DIAS

B.28. TOXICIDADE DÉRMICA SUBCRÓNICA: TESTE DE DOSE REPETIDA POR VIA DÉRMICA, A NOVENTA DIAS, EM ROEDORES

B.29. TOXICIDADE SUBCRÓNICA POR INALAÇÃO: ESTUDO DE 90 DIAS

B.30. ESTUDOS DE TOXICIDADE CRÓNICA

B.31. ESTUDO DE TOXICIDADE SOBRE O DESENVOLVIMENTO PRÉ-NATAL

B.32. ESTUDOS DE CARCINOGENICIDADE

B.33. ESTUDOS COMBINADOS DE TOXICIDADE CRÓNICA E CARCINOGENICIDADE

B.34. TESTE DE TOXICIDADE SOBRE A REPRODUÇÃO EM UMA GERAÇÃO

B.35. ESTUDO DE TOXICIDADE SOBRE A REPRODUÇÃO EM DUAS GERAÇÕES

B.36. TOXICOCINÉTICA

B.37. NEUROTOXICIDADE RETARDADA DE SUBSTÂNCIAS ORGANOFOSFORADAS POR EXPOSIÇÃO AGUDA

B.38. NEUROTOXICIDADE RETARDADA DE SUBSTÂNCIAS ORGANOFOSFORADAS POR ADMINISTRAÇÃO REPETIDA A 28 DIAS

B.39. ENSAIO *IN VIVO* DA SÍNTESE NÃO PROGRAMADA (UDS) DE ADN EM CÉLULAS DO FÍGADO DE MAMÍFEROS

B.40. CORROSÃO DA PELE *IN VITRO*: MÉTODO DE ENSAIO DA RESISTÊNCIA ELÉTRICA TRANSCUTÂNEA (RET)

B.40.A. CORROSÃO DA PELE *IN VITRO*: MÉTODO DE ENSAIO COM EPIDERME HUMANA RECONSTRUÍDA (RHE)

B.41. ENSAIO DE FOTOTOXICIDADE *IN VITRO* 3T3 NRU

B.42. SENSIBILIZAÇÃO CUTÂNEA: ENSAIO DE GÂNGLIOS LINFÁTICOS LOCAIS

▼B

B.43. ESTUDO DE NEUROTOXICIDADE EM ROEDORES

B.44. ABSORÇÃO CUTÂNEA: MÉTODO *IN VIVO*

B.45. ABSORÇÃO CUTÂNEA: MÉTODO *IN VITRO*

B.46. IRRITAÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO*: MÉTODO DE ENSAIO EM EPIDERME HUMANA RECONSTRUÍDA

B.47. MÉTODO DE ENSAIO DE OPACIDADE E PERMEABILIDADE DA CÓRNEA EM BOVINOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE PRODUTOS QUÍMICOS INDUTORES DE LESÕES OCULARES GRAVES E DE PRODUTOS QUÍMICOS QUE NÃO NECESSITEM DE SER CLASSIFICADOS EM TERMOS DE IRRITAÇÃO OCULAR NEM DE LESÕES OCULARES GRAVES

B.48. MÉTODO DE ENSAIO EM OLHOS DE FRANGO ISOLADOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE PRODUTOS QUÍMICOS INDUTORES DE LESÕES OCULARES GRAVES E DE PRODUTOS QUÍMICOS QUE NÃO NECESSITEM DE SER CLASSIFICADOS EM TERMOS DE IRRITAÇÃO OCULAR NEM DE LESÕES OCULARES GRAVES

B.49. ENSAIO *IN VITRO* DE MICRONÚCLEOS EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS

B.50. SENSIBILIZAÇÃO CUTÂNEA: ENSAIO DE GÂNGLIOS LINFÁTICOS LOCAIS: DA

B.51. SENSIBILIZAÇÃO CUTÂNEA: ENSAIO DE GÂNGLIOS LINFÁTICOS LOCAIS: BRDU-ELISA

B.52. TOXICIDADE AGUDA POR INALAÇÃO — MÉTODO DE CLASSIFICAÇÃO DE TOXICIDADE AGUDA

B.53. ESTUDO DE NEUROTOXICIDADE DURANTE O DESENVOLVIMENTO

B.54. BIOENSAIO UTEROTRÓFICO EM ROEDORES: ENSAIO DE DESPISTAGEM A CURTO PRAZO DE PROPRIEDADES ESTROGÉNICAS

B.55. BIOENSAIO DE HERSHBERGER NO RATO: ENSAIO DE DESPISTAGEM A CURTO PRAZO DE PROPRIEDADES (ANTI)ANDROGÉNICAS

B.56. ESTUDO ALARGADO DE TOXICIDADE DURANTE A REPRODUÇÃO NUMA GERAÇÃO

B.57. ENSAIO DE ESTEROIDOGÉNESE H295R

B.58. ENSAIOS DE MUTAÇÕES GENÉTICAS DAS CÉLULAS GERMINATIVAS E SOMÁTICAS DE ROEDORES TRANSGÉNICOS

B.59. SENSIBILIZAÇÃO CUTÂNEA *IN CHEMICO*: ENSAIO DE REATIVIDADE DIRETA DE PÉPTIDOS (DPRA)

B.60. SENSIBILIZAÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO*: MÉTODO DE ENSAIO ARE-NRF2 LUCIFERASE

B.61. MÉTODO DE ENSAIO DE DIFUSÃO DE FLUORESCEÍNA PARA IDENTIFICAÇÃO DE CORROSIVOS OCULARES E DE IRRITANTES OCULARES SEVEROS

B.62. ENSAIO DOS COMETAS *IN VIVO* COM CÉLULAS DE MAMÍFEROS EM MEIO ALCALINO

▼B

B.63. ENSAIO DE TOXICIDADE PARA A REPRODUÇÃO/O DESENVOLVIMENTO

B.64. ESTUDO DA TOXICIDADE DE DOSE REPETIDA COMBINADO COM O ENSAIO DE RASTREIO DA TOXICIDADE PARA A REPRODUÇÃO/O DESENVOLVIMENTO

B.65. MÉTODO DE ENSAIO *IN VITRO* DE MEMBRANA DE ESTANQUIDADE PARA A CORROSÃO CUTÂNEA

B.66. ENSAIOS DE TRANSATIVAÇÃO TRANSFETADA COM ESTABILIDADE PARA DETEÇÃO DE RECETORES DE ESTROGÉNIO AGONISTAS E ANTAGONISTAS E ANTAGONISTAS

B.67. ENSAIO DE MUTAÇÃO GENÉTICA EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS *IN VITRO* COM O GENE DA TIMIDINA-CINASE

B.68. MÉTODO DE ENSAIO IN VITRO DE EXPOSIÇÃO DE CURTA DURAÇÃO PARA IDENTIFICAR i) PRODUTOS QUÍMICOS INDUTORES DE LESÕES OCULARES GRAVES E ii) PRODUTOS QUÍMICOS QUE NÃO NECESSITAM DE SER CLASSIFICADOS EM TERMOS DE IRRITAÇÃO OCULAR NEM DE LESÕES OCULARES GRAVES

B.69. MÉTODO DE ENSAIO DO EPITÉLIO HUMANO SIMILAR À CÓRNEA RECONSTRUÍDO (RhCE), PARA IDENTIFICAÇÃO DE PRODUTOS QUÍMICOS QUE NÃO NECESSITAM DE CLASSIFICAÇÃO E ROTULAGEM EM MATÉRIA DE IRRITAÇÃO OCULAR E LESÕES OCULARES GRAVES

B.70. ENSAIOS *IN VITRO* DE RECETOR DE ESTROGÉNIO HUMANO RECOMBINANTE PARA DETEÇÃO DE PRODUTOS QUÍMICOS COM AFINIDADE LIGANTE COM O ER

B.71. ENSAIOS DE SENSIBILIZAÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO* RESPEITANTES A EVENTOS ESSENCIAIS DE ATIVAÇÃO DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS NA VIA DETERMINANTE DOS EFEITOS NOCIVOS PARA A SENSIBILIZAÇÃO CUTÂNEA

▼B

INTRODUÇÃO GERAL

A. **CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA EM ESTUDO**

Antes de iniciar qualquer estudo de toxicidade devem conhecer-se a composição da substância em estudo, incluindo as principais impurezas que contenha, e as propriedades físico-químicas mais importantes, nomeadamente a estabilidade.

As propriedades físico-químicas da substância fornecem informações de relevo para a escolha da via de administração e a concepção de cada estudo específico, bem como para o manuseamento e a armazenagem da substância.

O estudo deve ser precedido do desenvolvimento de um método analítico para a determinação qualitativa e quantitativa da substância em estudo (incluindo, sempre que possível, as principais impurezas) no meio de administração e no material biológico.

Devem incluir-se no relatório de ensaio todas as informações disponíveis referentes à identificação, às propriedades físico-químicas, à pureza e ao comportamento da substância em estudo.

B. **CUIDADOS COM OS ANIMAIS**

Nos estudos de toxicidade é fundamental efectuar um controlo estrito das condições ambientais e utilizar técnicas adequadas para o cuidado dos animais.

i) *Condições de alojamento*

As condições ambientais nos locais ou recintos destinados aos animais devem ser adequadas às espécies em estudo. Para ratos, ratinhos e cobaias, a temperatura do local deve ser de 22 ^{o}C ± 3 ^{o}C e a humidade relativa de 30 % a 70 %; no que respeita aos coelhos, a temperatura ambiente deve ser de 20 ^{o}C ± 3 ^{o}C e a humidade relativa de 30 % a 70 %.

Algumas técnicas experimentais são particularmente sensíveis aos efeitos da temperatura; em tais casos, a descrição do método de ensaio deve incluir pormenores relativos às condições adequadas. Em todos os ensaios de toxicidade, a temperatura e humidade devem ser controladas, registadas e referidas no relatório final.

A iluminação deve ser artificial, com uma alternância de 12 horas de luz e 12 horas de obscuridade. Os pormenores relativos à iluminação devem ser registados e incluídos no relatório final.

Salvo especificação em contrário, os animais devem ser alojados individualmente ou em pequenos grupos do mesmo sexo. Em caso de alojamento colectivo, não devem colocar-se mais de 5 animais numa gaiola.

Nos relatórios de experiências com animais, é conveniente indicar o tipo de gaiolas utilizadas e o número de animais alojados em cada gaiola, tanto durante o período de exposição à substância em estudo como durante o eventual período de observação subsequente.

▼B

ii) *Condições de alimentação*

A dieta deve satisfazer todos os requisitos nutricionais da espécie em estudo. No caso de as substâncias serem administradas aos animais na respectiva dieta, o valor nutricional da mesma pode ser reduzido pela interacção entre a substância e determinados constituintes da dieta. Essa possibilidade deve ser tida em conta na interpretação dos resultados dos ensaios. Podem utilizar-se dietas convencionais de laboratório, com um fornecimento ilimitado de água para beber. A escolha da dieta pode ser condicionada pela necessidade de assegurar a administração adequada da substância em estudo, caso se recorra a esta via.

Os eventuais contaminantes que influenciem a toxicidade não devem estar presentes em concentrações que possam interferir com os resultados.

C. **ENSAIOS ALTERNATIVOS**

A União Europeia está empenhada em promover a elaboração e validação de técnicas alternativas que forneçam a mesma quantidade de informações que os ensaios actuais em animais, mas que utilizem um número inferior de animais, lhes causem menor sofrimento ou evitem, de todo, o recurso aos mesmos.

Na caracterização dos riscos e consequente classificação e rotulagem dos produtos e para a avaliação da segurança química devem utilizar-se, sempre que possível, métodos deste tipo, à medida que se encontrem disponíveis.

D. **AVALIAÇÃO E INTERPRETAÇÃO**

Aquando da avaliação e interpretação dos ensaios devem ter-se em conta as limitações apresentadas pela extrapolação directa para o homem dos resultados obtidos em estudos com animais e *in vitro,* pelo que, para a confirmação dos referidos resultados, devem utilizar-se, sempre que se encontrem disponíveis, dados referentes a efeitos adversos no homem.

E. **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

A maioria dos métodos apresentados foram elaborados no âmbito do programa da OCDE das directrizes em matéria de ensaios, devendo os mesmos ser executados em conformidade com as boas práticas de laboratório, de modo a garantir, na medida do possível, o reconhecimento mútuo dos resultados.

Podem obter-se informações adicionais nas referências incluídas nas directrizes da OCDE, bem como em outras publicações no domínio em causa.

▼B

B.1.bis. **TOXICIDADE ORAL AGUDA — PROCEDIMENTO DE DOSE FIXA**

1. **MÉTODO**

O presente método é equivalente ao «Test Guideline» TG 420 da OCDE (2001).

1.1. INTRODUÇÃO

Os métodos tradicionais de avaliação de toxicidade aguda utilizam a morte dos animais como critério específico. Em 1984, foi sugerida pela British Toxicology Society uma nova abordagem ao ensaio da toxicidade aguda com base na administração de uma série de doses fixas (1). Esta abordagem evitava a utilização da morte dos animais como um critério específico. O novo método baseava-se na observação de sinais evidentes de toxicidade ocorrentes a determinado valor de uma série de doses fixas. Em 1992 e no seguimento dos estudos de validação *in vivo* efectuados tanto no Reino Unido (2) como internacionalmente (3), o procedimento foi adoptado como método de ensaio. Subsequentemente, as propriedades estatísticas do Procedimento de Dose Fixa foram avaliadas em vários estudos utilizando modelos matemáticos (4)(5)(6). Em conjunto, os estudos *in vivo* e de modelação mostraram que o procedimento é reprodutível, utiliza um menor número de animais e causa menor sofrimento do que os métodos tradicionais, permitindo classificar as substâncias de um modo semelhante a outros métodos de ensaio de toxicidade aguda.

No Documento de Orientação sobre Ensaios de Toxicidade Oral Aguda (7) podem consultar-se as orientações sobre a selecção do método de ensaio mais apropriado a determinado fim. Este Documento de Orientação contém igualmente informação adicional sobre o procedimento e interpretação do Método de Ensaio B.1.

Um dos princípios básicos do presente método consiste na utilização de doses moderadamente tóxicas no estudo principal, evitando a administração de doses previsivelmente letais. Além disso, não é necessário administrar doses para as quais se sabe previamente que causam dor e sofrimento óbvios, devido à sua acção corrosiva ou fortemente irritante. Os animais moribundos ou os animais que apresentam sinais óbvios de dor ou sofrimento grave e continuado devem ser sacrificados sem dor e, na interpretação dos resultados do ensaio, devem ser considerados do mesmo modo que os animais que morrem durante o ensaio. Os critérios sobre a decisão de sacrificar animais moribundos ou em sofrimento grave, bem como as orientações sobre a identificação de morte previsível ou iminente, estão incluídos separadamente num Documento de Orientação (8).

O presente método permite obter informação sobre a perigosidade e possibilita a graduação e classificação da substância em conformidade com o Sistema Harmonizado ao Nível Mundial (GHS) para a classificação de substâncias químicas que causam toxicidade aguda (9).

Antes de efectuar o estudo, o laboratório de ensaio deve ter em conta toda a informação disponível sobre a substância de ensaio. Esta informação incluirá a identificação e a estrutura química da substância, as suas propriedades físico-químicas, os resultados de quaisquer outros ensaios de toxicidade da substância *in vitro* ou *in vivo,* dados toxicológicos sobre substâncias estruturalmente semelhantes e a(s) utilização(ões) prevista(s) para a substância. Esta informação é necessária para satisfazer todos os envolvidos em relação à relevância do ensaio ao nível da protecção da saúde humana e será útil na determinação de uma dose inicial apropriada.

▼B

1.2. DEFINIÇÕES

Toxicidade oral aguda: refere-se ao conjunto de efeitos adversos que se manifestam após a administração oral de uma dose única da substância ou de várias doses num período de 24 horas.

Morte retardada: significa que o animal não morre nem aparenta estar moribundo num período de 48 horas, mas morre mais tarde, no decorrer do período de observação de 14 dias.

Dose: quantidade aplicada da substância de ensaio. O valor da dose é expresso em peso de substância de ensaio por unidade de peso do animal (mg/kg).

Toxicidade evidente: termo geral que descreve a ocorrência de sinais óbvios de toxicidade na sequência da administração da substância de ensaio [consultar os exemplos descritos em (3)] no qual a dose fixa mais elevada seguinte pode induzir, na maior parte dos animais, dor intensa, sinais persistentes de distúrbios graves, estado moribundo (os respectivos critérios são apresentados no Documento de Orientação de Critérios Específicos sem Dor (8) ou, provavelmente, mortalidade.

GHS: Sistema Harmonizado ao Nível Mundial (Globally Harmonised System) para a Classificação de Substâncias Químicas e Misturas. Trata-se de um trabalho conjunto da OCDE (saúde humana e ambiente), do Comité de Peritos em Transporte de Mercadorias Perigosas das Nações Unidas (propriedades fisico-químicas) e da OIT (notificação de perigos) e coordenado pelo Programa Interorganizações para a Boa Gestão das Substâncias Químicas [Interorganisation Programme for the Sound Management of Chemicals (IOMC)].

Morte iminente: situação em que se prevê a ocorrência de estado moribundo ou morte antes da próxima observação planeada. Alguns dos sinais indicativos deste estado em roedores incluem convulsões, posição lateral, posição deitada e tremores. [Consultar o Documento de Orientação de Critérios Específicos sem Dor (8) para mais detalhes.]

DL_{50} (Dose Letal Média): dose única, calculada estatisticamente, de uma substância susceptível de causar a morte de 50 % dos animais quando administrada por via oral. O valor da DL_{50} é expresso em peso, de substância de ensaio, por unidade de peso do animal de ensaio (mg/kg).

Teste-limite: refere-se a uma dose com o valor limite superior admitido pelo ensaio (2 000 ou 5 000 mg/kg).

Estado moribundo: encontrar-se num estado de morte ou de incapacidade de sobrevivência, mesmo com tratamento. [Consultar o Documento de Orientação de Critérios Específicos sem Dor (8) para mais detalhes.]

Morte previsível: presença de sinais clínicos indicativos de ocorrência de morte em determinada altura (antes do final planeado da experiência, por exemplo): incapacidade de alcançar água ou comida. [Consultar o Documento de Orientação de Critérios Específicos sem Dor (8) para mais detalhes.]

▼B

1.3. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

São administradas doses gradualmente crescentes a grupos de animais do mesmo sexo, usando as doses fixas de 5, 50, 300 e 2 000 mg/kg (excepcionalmente pode utilizar-se uma dose fixa adicional de 5 000 mg/kg; consultar a secção 1.6.2). A dose inicial é escolhida com base num estudo preliminar de determinação de amplitude como a dose para qual é previsível obter alguns sinais de toxicidade sem causar efeitos tóxicos graves ou mortalidade. Os sinais clínicos e as condições associadas com dor, sofrimento e morte iminente, são descritos detalhadamente num Documento de Orientações da OCDE separado (8). Outros grupos de animais poderão ser sujeitos a dosagens, com doses fixas superiores ou inferiores, consoante a presença ou ausência de sinais de toxicidade ou mortalidade. Repete-se este procedimento até identificação da dose que causa toxicidade evidente ou que provoque uma e apenas uma morte ou até à dose mais elevada no caso de não serem observados quaisquer efeitos. O procedimento é imediatamente interrompido no caso de se registarem mortes à dose mais baixa.

1.4. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.4.1. **Selecção de espécies animais**

A espécie preferida para ensaio é o rato, mas podem ser utilizadas outras espécies de roedores. Normalmente, utilizam-se fêmeas (7). Tal escolha deve-se ao facto de uma análise da literatura científica relativa aos ensaios convencionais de DL_{50} revelar que, habitualmente, a diferença de sensibilidade entre os sexos é pequena e, nos casos em que são observadas diferenças, as fêmeas são, de um modo geral, ligeiramente mais sensíveis (10). No entanto, devem utilizar-se machos caso as propriedades toxicológicas ou tóxico-cinéticas descritas para substâncias químicas estruturalmente semelhantes indicarem que estes podem revelar maior sensibilidade. Quando o ensaio é efectuado com machos, deve ser apresentada uma justificação adequada.

Devem ser utilizados animais adultos, jovens e saudáveis e pertencentes a estirpes laboratoriais de uso corrente. As fêmeas devem ser nulíparas e não grávidas. No início da administração das doses, todos os animais devem ter idades compreendidas entre as 8 e as 12 semanas e um peso compreendido no intervalo de ± 20 % do peso médio dos animais aos quais foram anteriormente administradas doses.

1.4.2. **Condições de alojamento e alimentação**

A temperatura do compartimento experimental dos animais deve ser de 22 °C (± 3°C). A humidade relativa deverá ser 50-60 %, embora sejam aceitáveis valores entre um mínimo de 30 % e um máximo que, de preferência, não deverá exceder 70 %, salvo durante os períodos de limpeza do compartimento. A iluminação deve ser artificial, com sequências de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão. A alimentação pode basear-se em dietas de laboratório convencionais, com fornecimento ilimitado de água para beber. Os animais aos quais é administrada a mesma dose, podem ser agrupados na mesma gaiola desde que, o número de animais em cada gaiola não impeça a observação clara de cada um deles.

1.4.3. **Preparação dos animais**

Os animais são escolhidos ao acaso, marcados de modo a permitir uma identificação individualizada e mantidos nas suas gaiolas durante, pelo menos, cinco dias antes do início da administração das doses de modo a permitir que se aclimatem às condições laboratoriais.

▼B

1.4.4. **Preparação das doses**

De um modo geral, as substâncias de ensaio devem ser administradas num volume constante ao longo de toda a gama de doses a ensaiar através da variação da concentração na preparação da dose. No entanto, para o caso do ensaio de um produto ou de uma mistura no estado líquido, pode ser mais relevante para a avaliação de risco subsequente a utilização da substância de ensaio sem qualquer diluição, ou seja, a concentração constante, sendo este um requisito apresentado por algumas autoridades competentes. Em qualquer dos casos, não deve ser excedido o volume máximo da dose a ser administrada. O volume máximo de líquido que pode ser administrado de cada vez depende do tamanho do animal de ensaio. No caso de roedores, em condições normais o volume não deve exceder 1 ml/100 g de peso corporal. Para soluções aquosas, contudo, pode ser considerada a dose de 2 ml/100 g de peso corporal. Recomenda-se que, sempre que possível, seja considerada em primeiro lugar a utilização de uma solução/suspensão/emulsão aquosa; caso tal não seja viável, pode considerar-se o uso de uma solução/suspensão/emulsão em óleo (por exemplo, óleo de milho); em última instância, poderá eventualmente recorrer-se ao uso de soluções noutros excipientes. Devem conhecer-se as características tóxicas dos excipientes que não sejam a água. As doses devem ser preparadas pouco tempo antes da sua administração, a menos que a estabilidade da preparação ao longo do período de utilização seja conhecida e tenha sido considerada aceitável.

1.5. PROCEDIMENTO

1.5.1. **Administração de doses**

A administração deve ser feita numa toma única, por sonda esofágica, usando tubo estomacal ou cânula de intubação apropriada. Nos casos raros em que não é possível a administração de uma toma única, a dose pode ser administrada em fracções menores ao longo de um período não superior a 24 horas.

Os animais devem ser sujeitos a jejum antes da administração das doses (por exemplo, no caso de ratos, não deve dar-se comida durante a noite, mas deve manter-se o fornecimento de água; no caso de ratinhos, a comida deve ser suspensa durante 3-4 horas e deve ser mantido o fornecimento de água). Após o período de jejum, os animais devem ser pesados e deve ser administrada a substância de ensaio. Após a administração da substância, pode evitar dar-se comida durante 3-4 horas para ratos e 1-2 horas para ratinhos. Nos casos de administração fraccionada da dose durante um certo lapso de tempo, pode ser necessário dar comida e água aos animais consoante a duração do período de administração.

1.5.2. **Estudo de determinação de amplitude**

O objectivo do estudo de determinação de amplitude consiste em seleccionar a dose inicial apropriada para o estudo principal. A substância de ensaio é administrada a um único animal de uma forma sequencial segundo os fluxogramas do anexo 1. O estudo de determinação de amplitude termina quando se pode seleccionar a dose inicial para o estudo principal (ou se for registada uma morte à dose fixa mais baixa).

Para o estudo de determinação de amplitude, a dose inicial é seleccionada de entre as doses fixas de 5, 50, 300 e 2 000 mg/kg, como sendo a dose que se prevê poder causar toxicidade evidente com base, se possível, nas evidências de dados *in vivo* e *in vitro* da mesma substância química ou de substâncias químicas estruturalmente semelhantes. Na ausência de tal informação, a dose inicial será de 300 mg/kg.

O intervalo de aplicação de doses a cada animal será de, pelo menos, 24 horas. Todos os animais devem ser observados durante um período de, pelo menos, 14 dias.

▼B

Excepcionalmente e apenas quando justificado por necessidades regulamentares específicas, pode ser considerada a utilização de uma dose fixa superior adicional de 5 000 mg/kg (consultar o Anexo 3). Por razões de protecção dos animais, é desencorajado o ensaio de animais na Categoria 5 do SHG (2 000-5 000 mg/kg). Esta dose só deve ser considerada quando existe uma elevada probabilidade dos resultados deste ensaio terem relevância directa na protecção dos animais, da saúde humana ou do ambiente.

Nos casos em que o animal de ensaio morre no estudo de determinação de amplitude quando se aplica a dose fixa mais baixa (5 mg/kg), o procedimento normal consiste em terminar o estudo e classificar a substância na Categoria 1 do GHS (tal como se indica no Anexo 1). No entanto, se for necessária uma confirmação adicional, pode ser efectuado um procedimento experimental suplementar, tal como se descreve seguidamente. Aplica-se uma dose de 5 mg/kg a um segundo animal. Se o segundo animal morrer confirma-se a Categoria 1 do GHS e o estudo é imediatamente terminado. Se o segundo animal sobreviver, será então administrada a dose de 5 mg/kg a um máximo de mais três animais. Dado que neste caso o risco de mortalidade é elevado, a administração das doses a estes animais deve ser feita de um modo sequencial, de modo a proteger os animais. O intervalo, entre a aplicação da dose a cada um dos animais, deve ser suficiente para assegurar a provável sobrevivência do animal anterior. Se ocorrer uma segunda morte, a sequência de aplicação da dose será terminada imediatamente e não serão ensaiados mais animais. Dado que, a ocorrência de uma segunda morte (independentemente do número de animais ensaiados até ao final do estudo) é classificável no resultado A (duas ou mais mortes), segue-se a regra de classificação do Anexo 2 para a dose fixa de 5 mg/kg (Categoria 1, se ocorrerem duas ou mais mortes, ou Categoria 2, se não ocorrer mais do que uma morte). Além disso, apresentam-se no Anexo 4 as orientações sobre a classificação segundo o sistema da UE, válido até à implementação do novo GHS.

1.5.3. **Estudo principal**

1.5.3.1. *Número de animais e doses*

No Anexo 2 apresentam-se os procedimentos a seguir após o ensaio com a dose inicial. É necessário proceder de uma das três formas seguintes: terminar os ensaios e classificar a substância na classe de perigosidade apropriada, prosseguir os ensaios como uma dose fixa superior, ou prosseguir os ensaios com uma dose fixa inferior. No entanto, por uma questão de protecção dos animais, a dose que causou morte, no estudo de determinação de amplitude, não deve ser repetida no estudo principal (consultar Anexo 2). A experiência prévia é indicativa de que o resultado mais provável da dose inicial será a possibilidade de classificação da substância, o que toma desnecessários quaisquer ensaios adicionais.

Será normalmente utilizado um total de cinco animais do mesmo sexo para cada dose investigada. O grupo de cinco animais será constituído por um animal do estudo prévio, ao qual foi administrada a dose seleccionada e de quatro outros animais (excepto, em casos raros, se a dose utilizada no estudo principal não tiver sido incluída no estudo de determinação de amplitude).

O intervalo de tempo entre a aplicação de doses em cada nível é determinado pelo aparecimento, duração e gravidade dos sinais de toxicidade. O tratamento dos animais com a dose seguinte deve ser adiado até ser possível estabelecer com segurança a sobrevivência dos animais previamente tratados. Recomenda-se um período de 3 ou 4 dias entre a administração das doses para cada nível de dosagem, se necessário, de modo a permitir a detecção de efeitos tóxicos retardados. O intervalo de tempo pode ser ajustado se necessário, por exemplo, em caso de resposta inconclusiva.

▼B

No caso de se considerar a utilização da dose fixa máxima de 5 000 mg/kg, deve proceder-se em conformidade com o procedimento descrito no Anexo 3. (Consultar igualmente a secção 1.6.2.)

1.5.3.2. *Teste-limite*

O teste-limite é utilizado, essencialmente, em situações nas quais o analista tem informação indicativa de o material de ensaio não ser provavelmente tóxico, ou seja, só apresenta toxicidade acima das doses-limite regulamentadas. A informação sobre a toxicidade do material de ensaio pode ser obtida a partir de ensaios em compostos semelhantes ou de ensaios de misturas ou produtos semelhantes, tendo em consideração a identificação e percentagem dos componentes cuja relevância toxicológica é conhecida. Nos casos em que a informação sobre a toxicidade do material de ensaio é limitada ou inexistente, ou nos casos em que é previsível que o material a ensaiar seja tóxico, deve ser efectuado o estudo principal.

Usando o procedimento normal para este ensaio, o teste-limite pode ser efectuado graças a um estudo de determinação de amplitude com uma dose inicial de 2 000 mg/kg (ou, excepcionalmente, de 5 000 mg/kg), seguido da administração da dose a mais quatro animais.

1.6. OBSERVAÇÕES

Após a aplicação da dose, os animais devem ser observados individualmente pelo menos uma vez durante os primeiros 30 minutos e periodicamente durante as primeiras 24 horas, com especial cuidado nas primeiras quatro horas. Seguidamente, é necessário observar os animais diariamente durante um período de 14 dias, excepto se for necessário retirá-los do estudo e sacrificá-los, sem dor, por motivo do bem-estar dos animais, ou se forem encontrados mortos. No entanto, a duração do período de observação não deve ser estabelecida de uma forma rígida, mas determinada com base nas reacções de toxicidade, velocidade do seu aparecimento e duração do período de recuperação, que pode ser prolongado, se for considerado necessário. O momento em que os sinais de toxicidade aparecem e desaparecem são importantes, sobretudo se os sinais de toxicidade tendem a aparecer de uma forma retardada (11). Todas as observações são registadas sistematicamente, mantendo-se uma ficha individual para cada animal.

Serão necessárias observações adicionais se os animais continuaram a apresentar sinais de toxicidade. As observações devem incluir alterações na pele e pêlos, olhos e membranas mucosas, aparelho respiratório, aparelho circulatório, sistema nervoso autónomo e central, assim como da actividade somatomotora e comportamental. Devem ser observados com especial atenção os tremores, convulsões, salivação, diarreia, letargia, sono e coma. Devem ser tomados em consideração os princípios e critérios resumidos no Documento de Orientação de Critérios Específicos sem Dor (8). Os animais que forem encontrados em estado moribundo e os animais que apresentarem dores violentas ou sinais de sofrimento grave e continuado devem ser sacrificados sem dor. Quando os animais forem sacrificados a fim de evitar dor ou se forem encontrados mortos, deve ser registado o momento da morte com o maior rigor possível.

1.6.1. **Peso corporal**

O peso individual dos animais deve ser determinado pouco antes da administração da substância de ensaio e, seguidamente, pelo menos uma vez por semana. Devem ser calculadas e registadas todas as variações de peso. No final do ensaio, os animais sobreviventes são pesados e, seguidamente, sacrificados sem dor.

▼B

1.6.2. **Patologia**

Todos os animais de ensaio (incluindo os que morreram durante o ensaio ou que foram retirados do ensaio por motivos de preservação do seu bem-estar) devem ser sujeitos a uma autópsia pouco pormenorizada. Devem ser registadas as alterações patológicas principais observadas em cada animal. Deve também ser considerada a realização de um exame microscópico dos órgãos que mostrem sinais de patologia grave em animais que sobreviveram, no mínimo, durante 24 horas após a aplicação da dose inicial, já que este exame pode fornecer informação útil.

2. **DADOS**

Devem ser apresentados os dados individuais para cada animal. Adicionalmente, todos os dados devem ser resumidos em forma tabular, mostrando, para cada grupo de ensaio, o número de animais utilizado, o número de animais que apresentaram sinais de toxicidade, o número de animais que foram encontrados mortos durante o ensaio ou que foram sacrificados a fim de evitar dor, o momento da morte de cada um dos animais, a descrição e evolução temporal dos efeitos de toxicidade e sua reversibilidade, assim como os resultados da autópsia.

3. **RELATÓRIO**

3.1. RELATÓRIO DO ENSAIO

O relatório do ensaio deverá incluir as seguintes informações:

Substância de ensaio:

— natureza física, pureza e propriedades físico-químicas relevantes (incluindo isomerização);

— dados relativos à identificação química, incluindo número CAS.

Excipiente (se apropriado):

— caso o excipiente não seja água, uma justificação para a sua escolha.

Animais de ensaio:

— espécie/estirpe usada;

— estado microbiológico do animal, caso seja conhecido;

— número, idade e sexo dos animais (incluindo, quando necessário, uma justificação para o uso de machos em vez de fêmeas);

— proveniência, condições de alojamento, dieta, etc.

Condições do ensaio:

— informação pormenorizada sobre a formulação da substância de ensaio, incluindo informação detalhada sobre a forma física do material administrado;

— informação pormenorizada sobre a administração da substância de ensaio, incluindo volume das doses e momento de aplicação;

— informação pormenorizada sobre a qualidade dos alimentos e da água (incluindo tipo e origem da dieta e origem da água);

— —justificação para a escolha da dose inicial.

▼B

Resultados:

— tabela dos dados de resposta e da dose para cada animal (ou seja, animais que apresentaram sinais de toxicidade, incluindo mortalidade, natureza, gravidade e duração dos efeitos);

— tabela com indicação do peso corporal e suas variações;

— pesos individuais de animais no dia em que é aplicada a dose, uma vez por semana no restante período e na altura da sua morte ou sacrifício;

— data e momento da morte, no caso de ocorrência de morte antes do sacrifício previsto;

— evolução temporal do aparecimento de sintomas de toxicidade e sua reversibilidade, para cada animal;

— resultados da autópsia e resultados histopatológicos para cada animal, caso se encontrem disponíveis.

Análise dos resultados.

Conclusões.

4. **REFERÊNCIAS**

(1) British Toxicology Society Working Party on Toxicity (1984). Special report: a new approach to the classification of substances and preparations on the basis of their acute toxicity. *Biometrics,* 20, 385.

(2) Van den Heuvel, M.J., Dayan, A.D. e Shillaker, R.O. (1987). Evaluation of the BTS approach to the testing of substances and preparations for their acute toxicity. *Human Toxicol.*, 6, p. 279--291.

(3) Van den Heuvel, M.J., Clark, D.G., Fielder, RJ., Koundakjian, P.P., Oliver, G.J.A., Pelling, D., Tomlinson, N.J. e Walker, A.P. (1990). The international validation of a fixed-dose procedure as an alternative to the classical LD_{50} test. *Fd. Chem. Toxicol.* 28, p. 469-482.

(4) Whitehead, A. e Curnow, R.N. (1992). Statistical evaluation of the fixed-dose procedure. *Fd. Chem. Toxicol*, 30, p. 313-324.

(5) Stallard, N. e Whitehead, A. (1995). Reducing numbers in the fixed-dose procedure. *Human Exptl. Toxicol*, 14, p. 315- 323.

(6) Stallard, N., Whitehead, A. and Ridgeway, P. (2002). Statistical evaluation of the revised fixed dose procedure.-Hum. Exp. Toxicol., 21, p. 183-196.

(7) OECD (2001). Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 24. Paris.

(8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assesment N. 19.

▼B

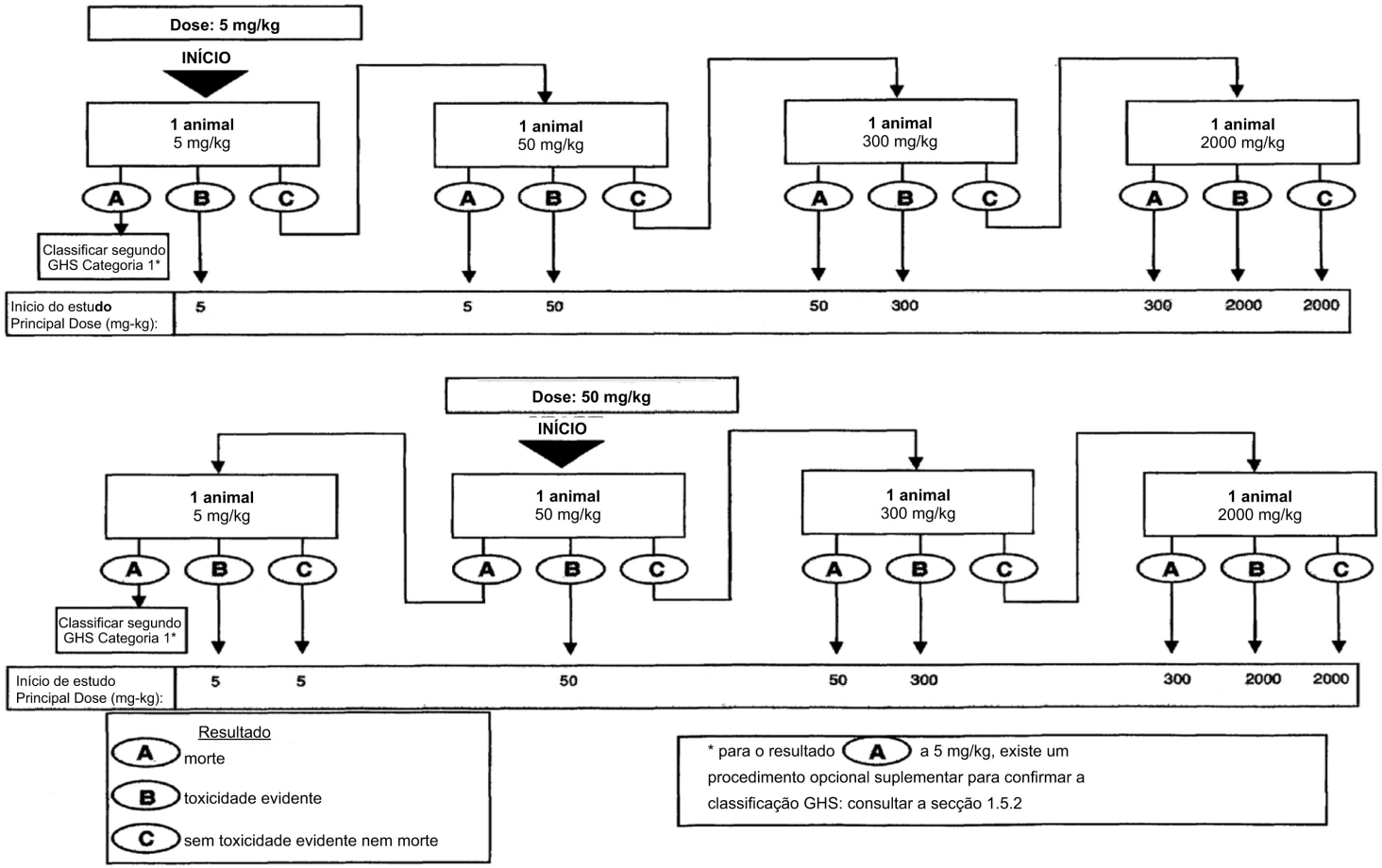
(9) OECD (1998). Harmonised Integrated Hazard Classification for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p. 11 [http://webnet1.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/ /0,3380,EN- documents-521-14-no-24-no-0,FF.html].

(10) Lipnick, R.L., Cotruvo, J.A., Hill, R.N., Bruce, R.D., Stitzel, K.A., Walker, A.P., Chu, I., Goddard, M., Segai, L., Springer, J.A. e Myers, R.C. (1995). Comparison of the Up-and-Down, Conventional LD_{50}, and Fixed-Dose Acute Toxicity Procedures. *Fd. Chem. Toxicol*, 33, p. 223-231.

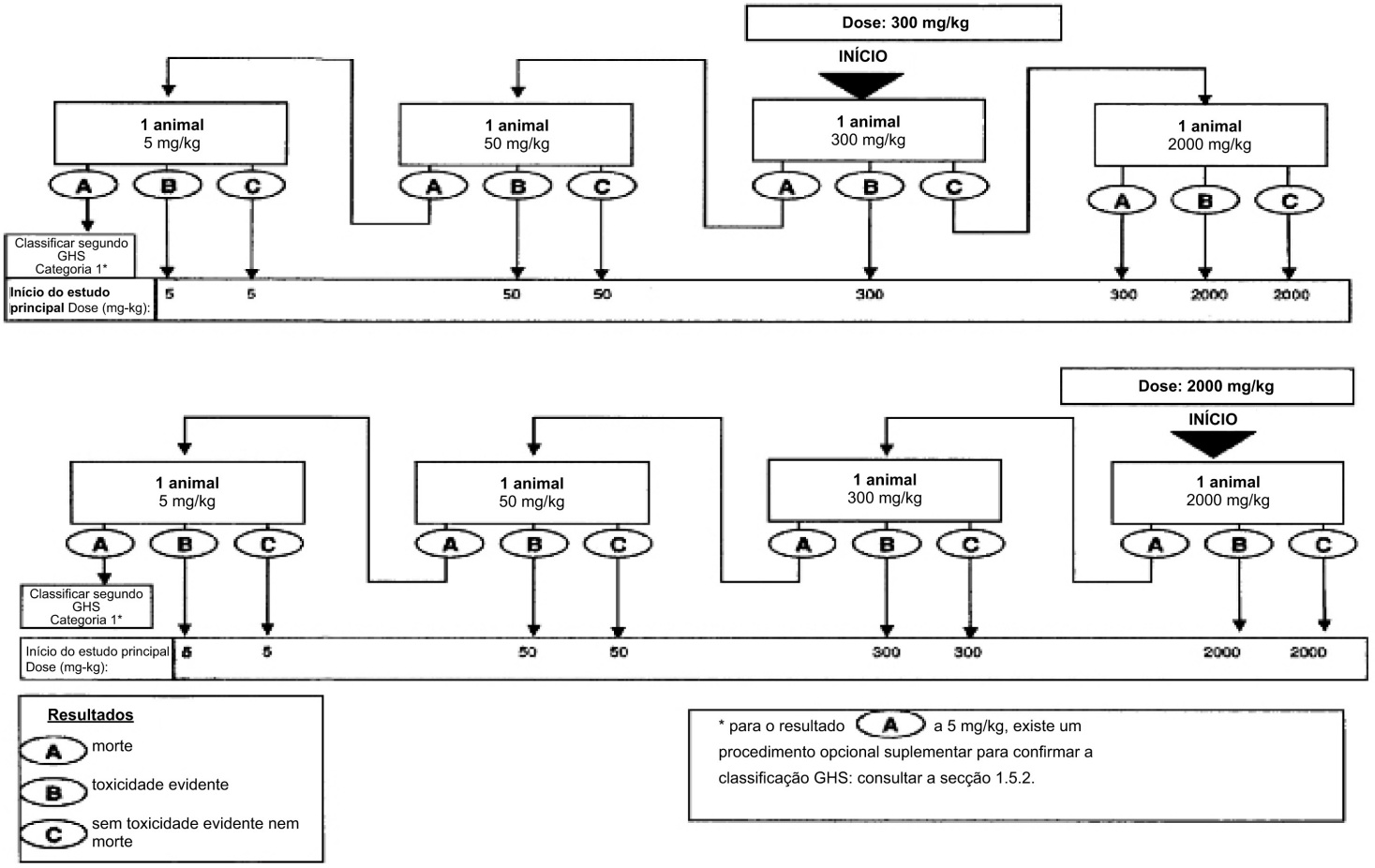
(11) Chan P.K e A.W. Hayes (1994), Chapter 16 Acute Toxicity and Eye Irritation . Em: *Principies and Methods of Toxicology*, 3 [a] Edição. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd, New York, USA.

ANEXO 1

FLUXOGRAMA PARA O ESTUDO DE DETERMINAÇÃO DE AMPLITUDE

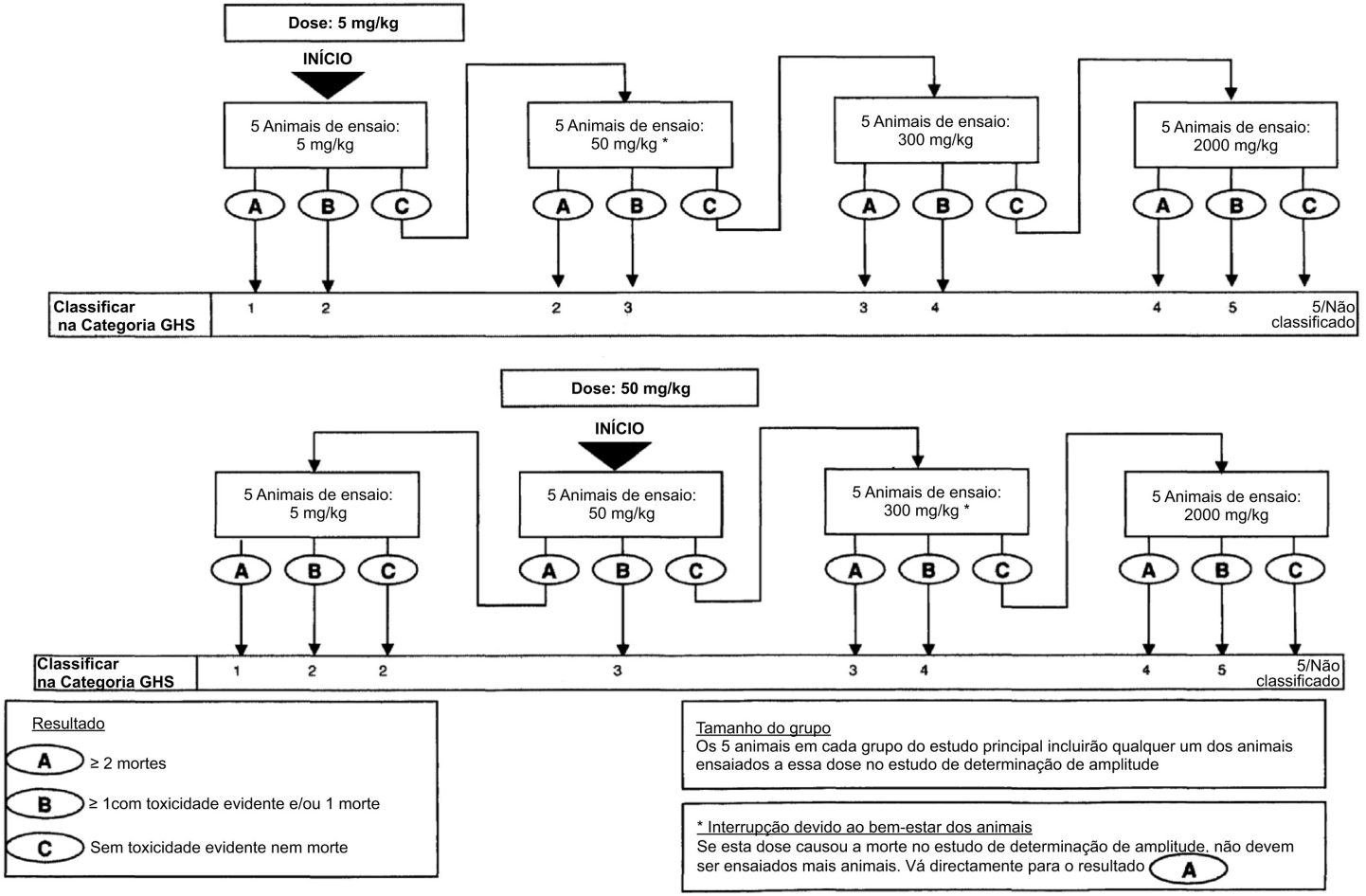


▼B

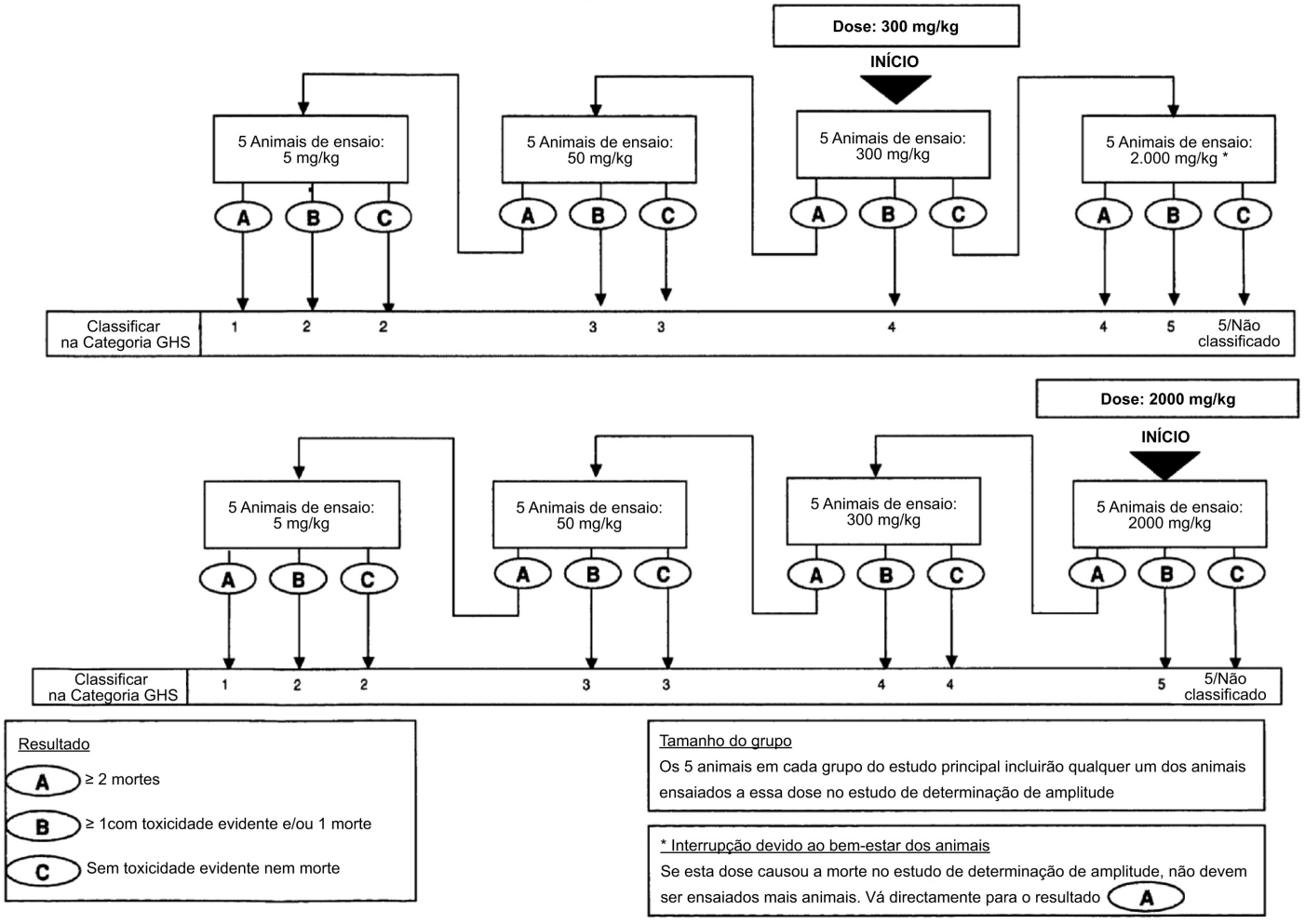

Dose: 300 mg/kg
INÍCIO
1 animal
5 mg/kg
1 animal
50 mg/kg
1 animal
300 mg/kg
1 animal
2000 mg/kg
A
B
C
Classificar segundo GHS Categoria 1*
Início do estudo principal Dose (mg-kg):
5
5
50
50
300
300
2000
2000
Dose: 2000 mg/kg
INÍCIO
1 animal
5 mg/kg
1 animal
50 mg/kg
1 animal
300 mg/kg
1 animal
2000 mg/kg
Classificar segundo GHS Categoria 1*
Início do estudo principal Dose (mg-kg):
5
5
50
50
300
300
2000
2000
Resultados
A morte
B toxicidade evidente
C sem toxicidade evidente nem morte
* para o resultado A a 5 mg/kg, existe um procedimento opcional suplementar para confirmar a classificação GHS: consultar a secção 1.5.2.

ANEXO 2

FLUXOGRAMA PARA O ESTUDO PRINCIPAL



▼B


Dose: 300 mg/kg
INÍCIO
5 Animais de ensaio: 5 mg/kg
5 Animais de ensaio: 50 mg/kg
5 Animais de ensaio: 300 mg/kg
5 Animais de ensaio: 2.000 mg/kg *
A B C
Classificar na Categoria GHS
1 2 2 3 3 4 4 5 5/Não classificado
Dose: 2000 mg/kg
INÍCIO
5 Animais de ensaio: 5 mg/kg
5 Animais de ensaio: 50 mg/kg
5 Animais de ensaio: 300 mg/kg
5 Animais de ensaio: 2000 mg/kg
A B C
Classificar na Categoria GHS
1 2 2 3 3 4 4 5 5/Não classificado
Resultado
A ≥ 2 mortes
B ≥ 1com toxicidade evidente e/ou 1 morte
C Sem toxicidade evidente nem morte
Tamanho do grupo
Os 5 animais em cada grupo do estudo principal incluirão qualquer um dos animais ensaiados a essa dose no estudo de determinação de amplitude
* Interrupção devido ao bem-estar dos animais
Se esta dose causou a morte no estudo de determinação de amplitude, não devem ser ensaiados mais animais. Vá directamente para o resultado A

▼B

ANEXO 3

CRITÉRIOS PARA A CLASSIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS DE ENSAIO COM VALORES PREVISÍVEIS DE DL_{50} SUPERIORES A 2 000 MG/KG PARA AS QUAIS NÃO É NECESSÁRIO EFECTUAR ENSAIO

Os critérios para a Categoria 5 de perigosidade destinam-se a permitir a identificação de substâncias de ensaio que representam um perigo de toxicidade aguda relativamente baixo, mas que, em certas circunstâncias, podem representar perigo para populações vulneráveis. É previsível que estas substâncias apresentem valores de DL_{50} orais ou dérmicos na gama de 2 000-5 000 mg/kg ou dose equivalente para outras vias. As substâncias de ensaio podem ser classificadas na categoria de perigosidade definida por: 2 000 mg/kg < DL_{50} < 5 000 mg/kg (Categoria 5 do GHS) nos seguintes casos:

a) se classificadas nesta categoria por qualquer dos esquemas de ensaio do anexo 2, baseados nas incidências de mortalidade;

b) se houver prova fiável indicativa de que os valores de DL_{50} se encontram na gama correspondente à Categoria 5 ou se outros estudos em animais ou sobre efeitos de toxicidade em seres humanos forem indicativos de preocupação acentuada em relação à salvaguarda da saúde humana;

c) através de extrapolação, estimativa ou medição de dados, desde que não seja garantida a atribuição a uma classe mais perigosa, e

— quando existe informação fiável indicativa de efeitos de toxicidade significativos em seres humanos, ou

— quando não é registada mortalidade nos ensaios por via oral até doses correspondentes aos valores para a Categoria 4, ou

— quando os especialistas são da opinião de que não se verificam sintomas clínicos de toxicidade significativos para ensaios até doses com valores correspondentes à Categoria 4, com excepção de diarreia, erecção pilosa ou má aparência, ou

— nos casos em que os especialistas confirmem a existência de informação fiável, proveniente de outros estudos com animais, indicativa da existência de potenciais efeitos agudos significativos.

ENSAIOS COM DOSES SUPERIORES A 2 000 MG/KG

Apenas pode ser considerada a utilização de uma dose fixa superior adicional de 5 000 mg/kg em casos excepcionais e justificados por necessidades específicas legais. Devido ao reconhecimento da necessidade de proteger o bem-estar dos animais, os ensaios com doses de 5 000 mg/kg são desencorajados e só devem ser considerados no caso de ser muito provável que os resultados desse ensaio tenham especial relevância para a protecção animal ou da saúde humana (9).

Estudo de determinação de amplitude

As regras de decisão para o procedimento sequencial apresentado no anexo 1 serão aplicadas ao ensaio com dose de 5 000 mg/kg. Assim, quando se utiliza uma dose de 5 000 mg/kg no estudo de determinação de amplitude, o resultado A (morte) requer o ensaio com um segundo animal com uma dose de 2 000 mg/kg. Os resultados B e C (toxicidade evidente ou sem toxicidade) permitem a selecção da dose de 5 000 mg/kg, como dose inicial do estudo principal. De igual modo, para uma dose inicial diferente de 5 000 mg/kg, o ensaio é realizado até à dose de 5 000 mg/kg se o resultado da dose de 2 000 mg/kg for B ou C. No caso de se obter um resultado A na subsequente dose de 5 000 mg/kg, a dose inicial do estudo principal deverá ser 2 000 mg/kg, enquanto para resultados B ou C deve utilizar-se uma dose inicial de 5 000 mg/kg no estudo principal.

▼B

Estudo principal

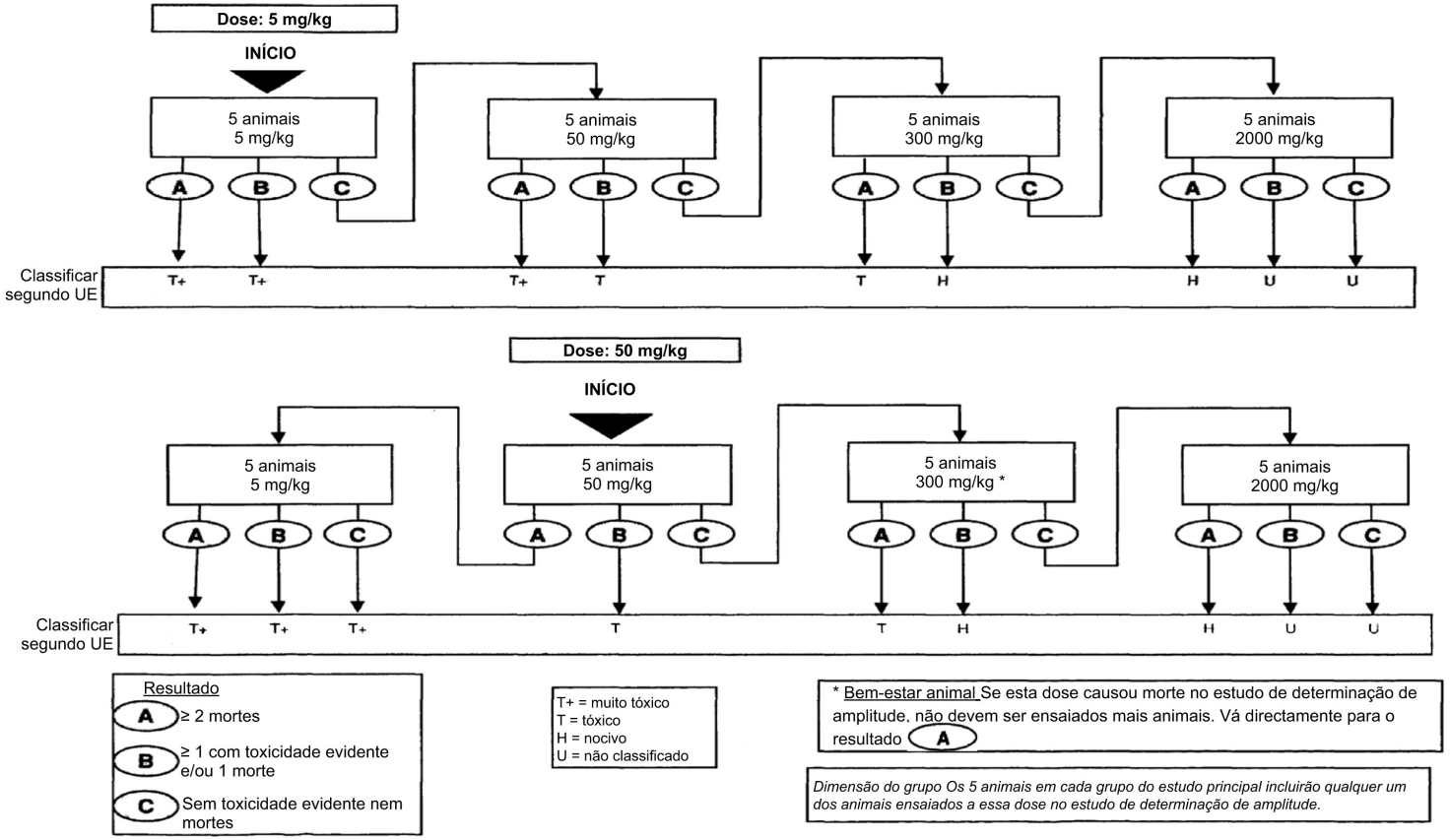
As regras de decisão para o procedimento sequencial apresentado no anexo 2 serão aplicadas ao ensaio com dose de 5 000 mg/kg. Assim, quando se utiliza uma dose de 5 000 mg/kg no estudo principal, o resultado A (> duas mortes) requer o ensaio com um segundo grupo, com uma dose de 2 000 mg/kg. Os resultados B (toxicidade evidente e/ou < uma morte) ou C (sem toxicidade) não permitem a classificação da substância em conformidade com o GHS. De igual modo, para uma dose inicial diferente de 5 000 mg/kg, o ensaio é realizado até à dose de 5 000 mg/kg se o resultado da dose de 2 000 mg/kg for C. No caso de se obter um resultado A na subsequente dose de 5 000 mg/kg, a substância será classificada na Categoria 5 do GHS, enquanto um resultado B ou C não permite a classificação da substância.

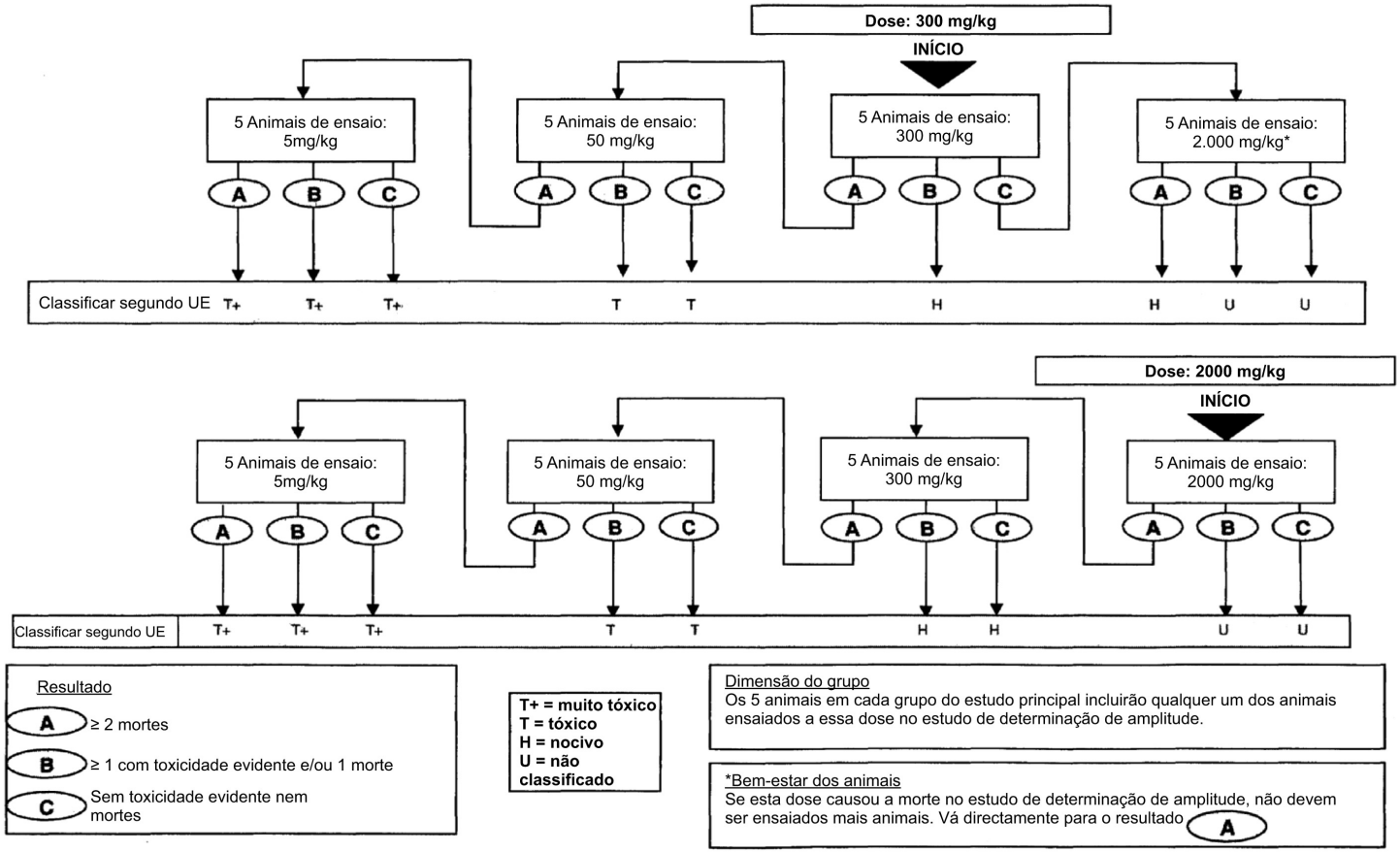
▼B

ANEXO 4

MÉTODO DE ENSAIO B.1 bis

Orientações sobre a classificação em conformidade com o esquema transitório da UE, válido até à implementação total do Sistema de Classificação Harmonizado a Nível Mundial (GHS) (obtido da referência (8))




Dose: 300 mg/kg
INÍCIO
5 Animais de ensaio: 5mg/kg
5 Animais de ensaio: 50 mg/kg
5 Animais de ensaio: 300 mg/kg
5 Animais de ensaio: 2.000 mg/kg*
A B C
Classificar segundo UE T+ T+ T+ T T H H U U
Dose: 2000 mg/kg
INÍCIO
5 Animais de ensaio: 5mg/kg
5 Animais de ensaio: 50 mg/kg
5 Animais de ensaio: 300 mg/kg
5 Animais de ensaio: 2000 mg/kg
A B C
Classificar segundo UE T+ T+ T+ T T H H U U
Resultado
A ≥ 2 mortes
B ≥ 1 com toxicidade evidente e/ou 1 morte
C Sem toxicidade evidente nem mortes
T+ = muito tóxico
T = tóxico
H = nocivo
U = não classificado
Dimensão do grupo
Os 5 animais em cada grupo do estudo principal incluirão qualquer um dos animais ensaiados a essa dose no estudo de determinação de amplitude.
*Bem-estar dos animais
Se esta dose causou a morte no estudo de determinação de amplitude, não devem ser ensaiados mais animais. Vá directamente para o resultado A

▼B

B.1.tris. **TOXICIDADE ORAL AGUDA — MÉTODO DE CLASSIFICAÇÃO DE TOXICIDADE AGUDA**

1. **MÉTODO**

O presente método é equivalente ao «Test Guideline» TG 423 da OCDE (2001)

1.1. INTRODUÇÃO

O método de classificação de toxicidade aguda (1) estabelecido no presente ensaio é um procedimento gradual que utiliza três animais do mesmo sexo por etapa. Em média, consoante a mortalidade e/ou o estado moribundo dos animais, são necessárias 2-4 etapas para avaliar a toxicidade aguda da substância de ensaio. O presente procedimento é reprodutível, utiliza uma quantidade muito limitada de animais e permite classificar as substâncias de um modo semelhante a outros métodos de ensaio de toxicidade aguda. O método de classificação de toxicidade aguda baseia-se na avaliação biométrica (2) (3) (4) (5) com doses fixas, separadas apropriadamente de modo a permitir a avaliação da substância para fins de classificação e avaliação de perigosidade. O método, adoptado inicialmente em 1996, foi amplamente validado *in vivo* relativamente aos dados de DL_{50} publicados na literatura nacional (6) e internacional (7).

No Documento de Orientação sobre Ensaios de Toxicidade Oral Aguda (8) podem consultar-se as orientações sobre a selecção do método de ensaio mais apropriado a determinado fim. Este Documento de Orientação contém igualmente informação adicional sobre o procedimento e interpretação do Método de Ensaio B.1.tris.

No presente método de ensaio não é necessário administrar doses de substâncias de ensaio, que comprovadamente causam dor e sofrimento óbvios, devido à sua acção corrosiva ou gravemente irritante. Os animais moribundos ou que apresentam sinais óbvios de dor ou sofrimento grave e continuado devem ser sacrificados sem dor e, na interpretação dos resultados do ensaio, considerados do mesmo modo que os animais que morrem durante o ensaio. Os critérios sobre a decisão de sacrificar animais moribundos ou em sofrimento, bem como as orientações sobre o reconhecimento de morte previsível ou iminente, estão incluídos separadamente num Documento de Orientação (9).

O presente método utiliza doses estabelecidas previamente e os resultados permitem classificar a substância em conformidade com o Sistema Harmonizado ao Nível Mundial (GHS) para a classificação de substâncias químicas que causam toxicidade aguda (10).

Em princípio, o método não se destina a calcular rigorosamente os valores de DL_{50}, mas permite a determinação de gamas de exposição definidas, nas quais é expectável a ocorrência de mortes, dado que um dos principais critérios específicos do ensaio é a morte de uma dada proporção de animais. O método permite determinar valores de DL_{50} somente quando, pelo menos, duas das doses utilizadas resultam numa mortalidade superior a 0 % e inferior a 100 %. A utilização de uma selecção de doses, previamente estabelecidas, independentemente da substância de ensaio, com a classificação especificamente dependente do número de animais observados em vários estados melhora as condições de comunicação de resultados entre laboratórios, bem como a consistência e a repetibilidade dos resultados.

▼B

Antes de efectuar o estudo, o laboratório de ensaio deve ter em conta toda a informação disponível sobre a substância de ensaio. Esta informação incluirá a identificação e a estrutura química da substância, as suas propriedades físico-químicas, os resultados de quaisquer outros ensaios de toxicidade da substância *in vitro* ou *in vivo,* dados toxicológicos sobre substâncias estruturalmente semelhantes e a(s) utilização(ões) prevista(s) para a substância. Esta informação é necessária para satisfazer todos os envolvidos em relação à relevância do ensaio ao nível da protecção da saúde humana e será útil na determinação da dose inicial mais adequada.

1.2. DEFINIÇÕES

Toxicidade oral aguda: refere-se ao conjunto de efeitos adversos que se manifestam após a administração oral de uma dose única da substância ou de várias doses num período de 24 horas.

Morte retardada: significa que o animal não morre nem aparenta estar moribundo num período de 48 horas, mas morre mais tarde, no decorrer do período de observação de 14 dias.

Dose: quantidade aplicada da substância de ensaio. O valor da dose é expresso em peso de substância de ensaio por unidade de peso de animal de ensaio (por exemplo, mg/kg).

GHS: Sistema Harmonizado ao Nível Mundial (Globally Harmonised System) para a Classificação de Substâncias Químicas e Misturas. Trata-se de um trabalho conjunto da OCDE (saúde humana e ambiente), do Comité de Peritos em Transporte de Mercadorias Perigosas das Nações Unidas (propriedades físico-químicas) e da OIT (notificação de perigos) e coordenado pelo Programa Interorganizações para a Boa Gestão das Substâncias Químicas [Interorganisation Programme for the Sound Management of Chemicals (IOMC)].

Morte iminente: situação em que se prevê a ocorrência de estado moribundo ou morte antes da seguinte observação planeada. Alguns dos sinais indicativos deste estado em roedores incluem convulsões, posição lateral, posição deitada e tremores. [Para informação detalhada, consultar o Documento de Orientação sobre Critérios Específicos sem Dor (9)].

DL_{50} (Dose Letal Média): dose única, calculada estatisticamente, de uma substância susceptível de causar a morte de 50 % dos animais quando administrada por via oral. O valor da DL_{50} é expresso em peso de substância de ensaio por unidade de peso de animal de ensaio (mg/kg).

Dose-limite: refere-se a uma dose com o valor-limite superior admitido pelo ensaio (2 000 ou 5 000 mg/kg).

Estado moribundo: encontrar-se num estado de morte ou de incapacidade de sobrevivência, mesmo com tratamento. [Para informação detalhada, consultar o Documento de Orientação sobre Critérios Específicos sem Dor (9).]

Morte previsível: presença de sinais clínicos indicativos de ocorrência de morte em determinada altura, antes do final planeado da experiência; por exemplo: incapacidade de alcançar água ou comida. [Consultar o Documento de Orientação de Critérios Específicos sem Dor (9) para mais detalhes.]

▼B

1.3. PRINCÍPIO DO ENSAIO

O princípio do presente ensaio é que, com base num procedimento gradual com a utilização de um número mínimo de animais por etapa, é possível obter informação suficiente sobre a toxicidade aguda de uma substância de ensaio, de modo a permitir a sua classificação. A substância é administrada, por via oral, a um grupo de animais de ensaio a uma das doses anteriormente definidas. A substância é ensaiada utilizando um procedimento gradual, em que cada etapa utiliza três animais do mesmo sexo (normalmente fêmeas). A existência ou inexistência de mortalidade, relacionada com composto, dos animais tratados numa dada etapa, determinará a etapa seguinte, ou seja:

— não são necessários mais ensaios,

— é administrada a mesma dose a mais três animais,

— é administrada a dose seguinte, maior ou menor, a mais três animais.

No anexo 1 apresenta-se informação detalhada sobre o procedimento de ensaio. O método permitirá uma avaliação conducente à classificação da substância de ensaio numa das classes de toxicidade definidas pelos valores-limite de DL_{50}.

1.4. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.4.1. **Selecção de espécies animais**

A espécie de roedores preferida para ensaio é o rato, mas podem ser utilizadas outras espécies de roedores. Normalmente, utilizam-se fêmeas (9). Tal escolha deve-se ao facto de uma análise da literatura científica relativa aos ensaios convencionais de DL_{50} revelar que, habitualmente, a diferença de sensibilidade entre os sexos é pequena e, nos casos em que são observadas diferenças, as fêmeas são, de um modo geral, ligeiramente mais sensíveis (11). No entanto, devem utilizar-se machos caso as propriedades toxicológicas ou tóxico-cinéticas descritas para substâncias químicas estruturalmente semelhantes indicarem que estes podem revelar maior sensibilidade. Quando o ensaio é efectuado com machos, deve ser apresentada uma justificação adequada.

Devem ser utilizados animais adultos, jovens e saudáveis e pertencentes a estirpes laboratoriais de uso corrente. As fêmeas devem ser nulíparas e não grávidas. No início da administração das doses, todos os animais devem ter idades compreendidas entre as 8 e as 12 semanas e um peso compreendido no intervalo de ± 20 % do peso médio dos animais aos quais foram anteriormente administradas doses.

1.4.2. **Condições de alojamento e alimentação**

A temperatura do compartimento experimental dos animais deve ser 22°C (± 3°C). A humidade relativa deverá ser 50 %-60 %, embora sejam aceitáveis valores entre um mínimo de 30 % e um máximo que, de preferência, não deverá exceder 70 %, salvo durante os períodos de limpeza do compartimento. A iluminação deve ser artificial, com sequências de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão. A alimentação pode basear-se em dietas de laboratório convencionais, com fornecimento ilimitado de água para beber. Os animais aos quais é administrada a mesma dose podem ser agrupados na mesma gaiola, desde que o número de animais em cada gaiola não impeça a observação clara de cada um deles.

▼B

1.4.3. **Preparação dos animais**

Os animais são escolhidos ao acaso, marcados de modo a permitir uma identificação individualizada e mantidos nas suas gaiolas durante, pelo menos, cinco dias antes do início da administração das doses para que se aclimatem às condições laboratoriais.

1.4.4. **Preparação das doses**

De um modo geral, as substâncias de ensaio devem ser administradas num volume constante ao longo de toda a gama de doses a ensaiar através da variação da concentração na preparação da dose. No entanto, para o caso do ensaio de um produto ou de uma mistura no estado líquido, pode ser mais relevante para a avaliação de risco subsequente a utilização da substância de ensaio sem qualquer diluição, ou seja, a concentração constante, sendo este um requisito apresentado por algumas autoridades competentes. Em qualquer dos casos, não deve ser excedido o volume máximo da dose a ser administrada. O volume máximo de líquido que pode ser administrado de cada vez depende do tamanho do animal de ensaio. No caso de roedores, o volume não deve exceder, em condições normais, 1 ml/100 g de peso corporal. Para soluções aquosas, contudo, pode ser considerada a dose de 2 ml/100 g de peso corporal. Recomenda-se que, sempre que possível, seja considerada em primeiro lugar a utilização de uma solução/suspensão/ /emulsão aquosa; caso tal não seja viável, pode considerar-se o uso de uma solução/suspensão/emulsão em óleo (por exemplo, óleo de milho); em última instância, poderá eventualmente recorrer-se ao uso de soluções noutros excipientes. Devem conhecer-se as características toxicológicas dos excipientes que não sejam a água. As doses devem ser preparadas pouco tempo antes da sua administração, a menos que a estabilidade da preparação ao longo do período de utilização seja conhecida e tenha sido considerada aceitável.

1.5. PROCEDIMENTO

1.5.1. **Administração de doses**

A administração por sonda esofágica deve ser feita, de preferência, numa toma única, usando um tubo estomacal ou uma cânula de intubação apropriada. Nos casos raros em que não é possível a administração de uma toma única, a dose pode ser administrada em fracções menores ao longo de um período não superior a 24 horas.

Os animais devem ser sujeitos a jejum antes da administração das doses (por exemplo, no caso de ratos, não deve dar-se comida durante a noite, mas deve manter-se o fornecimento de água; no caso de ratinhos, a comida deve ser suspensa durante 3-4 horas e deve ser mantido o fornecimento de água). Após o período de jejum, os animais devem ser pesados e deve ser administrada a substância de ensaio. Após a administração da substância, pode evitar dar-se comida durante 3-4 horas para ratos e 1-2 horas para ratinhos. Nos casos de administração fraccionada da dose durante um certo lapso de tempo, pode ser necessário dar comida e água aos animais, consoante a duração do período de administração.

1.5.2. **Número de animais e doses**

São utilizados três animais em cada etapa. A dose a utilizar inicialmente deve ser seleccionada entre uma das quatro doses fixas de 5, 50, 300 e 2 000 mg/kg de peso corporal. A dose inicial deve ser aquela que apresenta maior probabilidade de induzir mortalidade em alguns dos animais tratados. Os fluxogramas do anexo 1 descrevem o procedimento a seguir para cada uma das doses iniciais. Apresentam-se ainda, no anexo 4, as orientações sobre a classificação segundo o sistema da UE, em vigor até à implementação do novo GHS.

▼B

Quando a informação disponível for indicativa de que não é muito provável que ocorra mortalidade com a maior dose inicial (2 000 mg/kg de peso corporal), deve efectuar-se um teste-limite. Quando não existir qualquer informação disponível sobre a substância de ensaio, recomenda-se a utilização de uma dose inicial de 300 mg/kg de peso corporal por razões de protecção dos animais.

O intervalo de tempo entre os grupos de tratamento é determinado pelo aparecimento, duração e gravidade dos sinais de toxicidade. O tratamento dos animais com a dose seguinte deve ser adiado até ser possível estabelecer com segurança a sobrevivência dos animais previamente tratados.

Excepcionalmente, e apenas quando justificado por necessidades legais específicas, pode ser considerada a utilização de uma dose fixa superior adicional de 5 000 mg/kg (consultar o anexo 2). Por razões de protecção dos animais, é desencorajado o ensaio de animais na Categoria 5 do GHS (2 000-5 000 mg/kg) e esta dose só deve ser considerada quando existe uma elevada probabilidade de os resultados deste ensaio terem relevância directa para a protecção da saúde humana ou dos animais ou do ambiente.

1.5.3. **Teste-limite**

O teste-limite é utilizado, essencialmente, em situações nas quais o analista tem informação indicativa do material de ensaio não ser provavelmente tóxico, ou seja, só apresenta toxicidade acima das doses limite regulamentadas. A informação sobre a toxicidade do material de ensaio pode ser obtida a partir de ensaios em compostos semelhantes ou de ensaios de misturas ou produtos semelhantes, tendo em consideração a identificação e percentagem dos componentes cuja relevância toxicológica é conhecida. Nos casos em que a informação sobre a sua toxicidade é limitada ou inexistente ou nos casos em que é previsível que o material a ensaiar seja tóxico, deve ser efectuado o estudo principal.

Pode ser efectuado um teste-limite a uma dose de 2 000 mg/kg de peso corporal com seis animais (três animais por etapa). Excepcionalmente, pode ser efectuado um teste-limite a uma dose de 5 000 mg/kg de peso corporal com três animais (consultar o anexo 2). Caso ocorra mortalidade na sequência da administração da substância de ensaio, pode ser necessário efectuar ensaios posteriores com a dose inferior seguinte.

1.6. OBSERVAÇÕES

Após a aplicação da dose, os animais devem ser observados individualmente, pelo menos uma vez durante os primeiros trinta minutos e periodicamente durante as primeiras 24 horas, com especial cuidado nas primeiras quatro horas. Em seguida, é necessário observar os animais diariamente, durante um período de 14 dias, excepto se for necessário retirá-los do estudo e sacrificá-los sem dor por motivo de bem-estar dos animais, ou se forem encontrados mortos. No entanto, a duração do período de observação não deve ser estabelecida de uma forma rígida, mas determinada com base nas reacções de toxicidade, velocidade do seu aparecimento e duração do período de recuperação, que pode ser prolongado, se considerado necessário. O momento em que os sinais de toxicidade aparecem e desaparecem são importantes, sobretudo se os sinais de toxicidade tendem a aparecer de uma forma retardada (12). Todas as observações são registadas sistematicamente, mantendo-se uma ficha individual para cada animal.

▼B

Serão necessárias observações adicionais se os animais continuarem a apresentar sinais de toxicidade. As observações devem incluir alterações na pele e pêlos, olhos, membranas mucosas, aparelho respiratório, aparelho circulatório, sistema nervoso autónomo e central, assim como na actividade somatomotora e comportamental. Devem ser observados com especial atenção os tremores, convulsões, salivação, diarreia, letargia, sono e coma. Devem ser tomados em consideração os princípios e critérios resumidos no Documento de Orientação de Critérios Específicos sem Dor (9). Os animais que forem encontrados em estado moribundo e os animais que apresentarem dores violentas ou sinais de sofrimento intenso e continuado devem ser sacrificados sem dor. Quando os animais forem sacrificados a fim de evitar dor ou se forem encontrados mortos, deve ser registado o momento da morte com o maior rigor possível.

1.6.1. **Peso corporal**

O peso individual dos animais deve ser determinado imediatamente após a administração da substância de ensaio e, seguidamente, pelo menos uma vez por semana. Devem ser calculadas e registadas todas as variações de peso. No final do ensaio, os animais sobreviventes são pesados e, seguidamente, sacrificados sem dor.

1.6.2. **Patologia**

Todos os animais de ensaio (incluindo aqueles que morreram durante o ensaio ou que foram retirados do ensaio por motivos de preservação do bem-estar do animal) devem ser sujeitos a uma autópsia pouco pormenorizada. Devem ser registadas as alterações patológicas principais observadas em cada animal. Deve também ser considerada a realização de um exame microscópico dos órgãos que mostrem sinais de patologia grave em animais que sobreviveram, no mínimo, 24 horas após a aplicação da dose inicial, já que este exame pode fornecer informação útil.

2. **DADOS**

Devem ser apresentados os dados individuais para cada animal. Adicionalmente, todos os dados devem ser resumidos em forma tabular, mostrando, para cada grupo de ensaio, o número de animais utilizado, o número de animais que apresentaram sinais de toxicidade, o número de animais que foram encontrados mortos durante o ensaio ou que foram sacrificados a fim de evitar dor, o momento da morte de cada um dos animais, a descrição e evolução temporal dos efeitos de toxicidade e sua reversibilidade, assim como os resultados da autópsia.

3. **RELATÓRIO**

3.1. **Relatório do ensaio**

O relatório do ensaio deverá incluir as seguintes informações:

Substância de ensaio:

— natureza física, pureza e propriedades físico-químicas relevantes (incluindo isomerização);

— dados relativos à identificação química, incluindo o número CAS.

Excipiente (se apropriado):

— caso o excipiente não seja água, uma justificação para a sua escolha.

Animais de ensaio:

— espécie/estirpe usada;

▼B

— estado microbiológico do animal, caso seja conhecido;

— número, idade e sexo dos animais (incluindo, quando necessário, uma justificação para o uso de machos em vez de fêmeas);

— proveniência, condições de alojamento, dieta, etc.

Condições do ensaio:

— informação pormenorizada sobre a formulação da substância, incluindo informação pormenorizada sobre a forma física do material administrado;

— informação pormenorizada sobre a administração da substância de ensaio, incluindo volume das doses e o momento da aplicação;

— informação pormenorizada sobre a qualidade dos alimentos e da água (incluindo tipo e origem da dieta, origem da água);

— justificação para a escolha da dose inicial.

Resultados:

— tabela dos dados de resposta e da dose para cada animal (ou seja, animais que apresentaram sinais de toxicidade, incluindo mortalidade, natureza, gravidade e duração dos efeitos);

— tabela com indicação do peso corporal e suas variações;

— pesos individuais de animais no dia em que é aplicada a dose, uma vez por semana no restante período e na altura da sua morte ou sacrifício;

— data e momento da morte, no caso de ocorrência de morte antes do sacrifício previsto;

— evolução temporal do aparecimento de sintomas de toxicidade e sua reversibilidade para cada animal;

— resultados da autópsia e resultados histopatológicos para cada animal, caso se encontrem disponíveis.

Análise dos resultados.

Conclusões.

4. **REFERÊNCIAS**

(1) Roll R., Höfer-Bosse Th. And Kayser D., (1986) New Perspectives in Acute Toxicity Testing of Chemicals. Toxicol. Lett., Suppl. 31, p. 86.

(2) Roll R., Riebschläger M., Mischke U. and Kayser D., (1989). Neue Wege zur Bestimmung der akuten Toxizität von Chemikalien. Bundesgesundheitsblatt 32, p. 336-341.

(3) Diener W., Sichha L., Mischke U., Kayser D. and Schlede E., (1994) The Biometric Evaluation of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 68, p. 559-610.

(4) Diener W., Mischke U., Kayser D. and Schlede E., (1995) The Biometric Evaluation of the OECD Modified Version of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 69, p. 729-734.

(5) Diener W., and Schlede E., (1999) Acute Toxicity Class Methods: Alterations to LD/LC_{50} Tests. ALTEX 16, p. 129-134.

(6) Schlede E., Mischke U., Roll R. and Kayser D., (1992) A National Validation Study of the Acute-Toxic- Class Method — An Alternative to the LD_{50} Test. Arch. Toxicol. 66, p. 455-470.

▼B

(7) Schlede E., Mischke U., Diener W. and Kayser D., (1994) The International Validation Study of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 69, p. 659-670.

(8) OECD, (2001) Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 24. Paris.

(9) OECD, (2000) Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 19.

(10) OECD, (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System For Human Health And Environmental Effects Of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p. 11. [http://webnet1.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/ /0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html].

(11) Lipnick R. L., Cotruvo, J. A., Hill R. N., Bruce R. D., Stitzel K. A., Walker A. P., Chu I.; Goddard M, Segal L., Springer J. A. and Myers R. C., (1995) Comparison of the Up-and Down, Conventional LD_{50}, and Fixed Dose Acute Toxicity Procedures. Fd. Chem. Toxicol 33, p. 223-231.

(12) Chan P.K. and A.W. Hayes., (1994) Chap. 16. Acute Toxicity and Eye Irritancy. *Principles and Methods of Toxicology*. Third Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press Ltd., New York, USA.

▼B

ANEXO 1

PROCEDIMENTO A SEGUIR PARA CADA UMA DAS DOSES INICIAIS

CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os esquemas de ensaio, descritos no presente anexo, descrevem esquematicamente o procedimento a seguir para cada dose inicial.

— Anexo 1a: a dose inicial é de 5 mg/kg p.c.

— Anexo 1b: a dose inicial é de 50 mg/kg p.c.

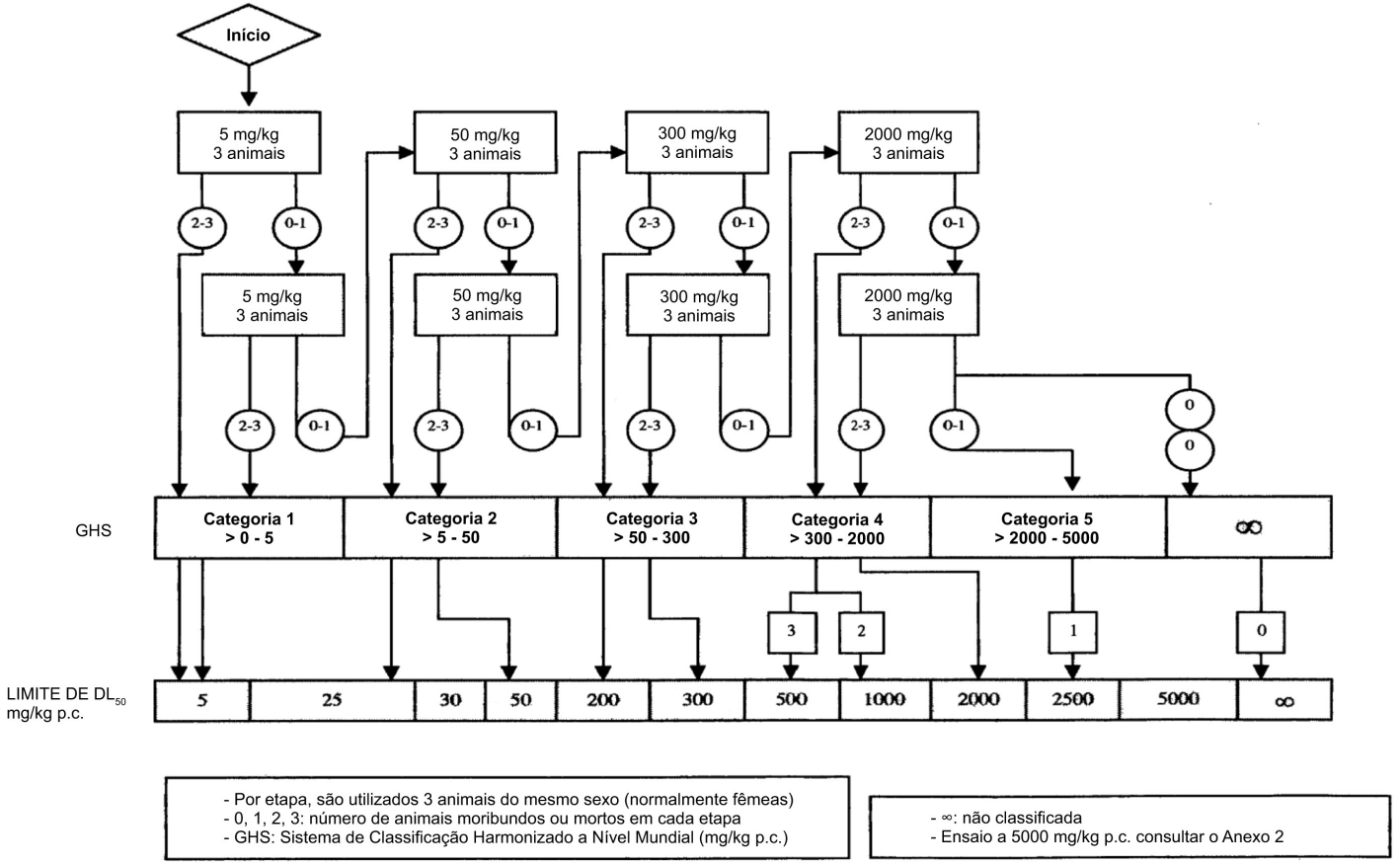
— Anexo 1c: a dose inicial é de 300 mg/kg p.c.

— Anexo 1d: a dose inicial é de 2 000 mg/kg p.c.

Consoante o número de animais sacrificados sem dor ou mortos, o procedimento de ensaio segue as setas respectivas.

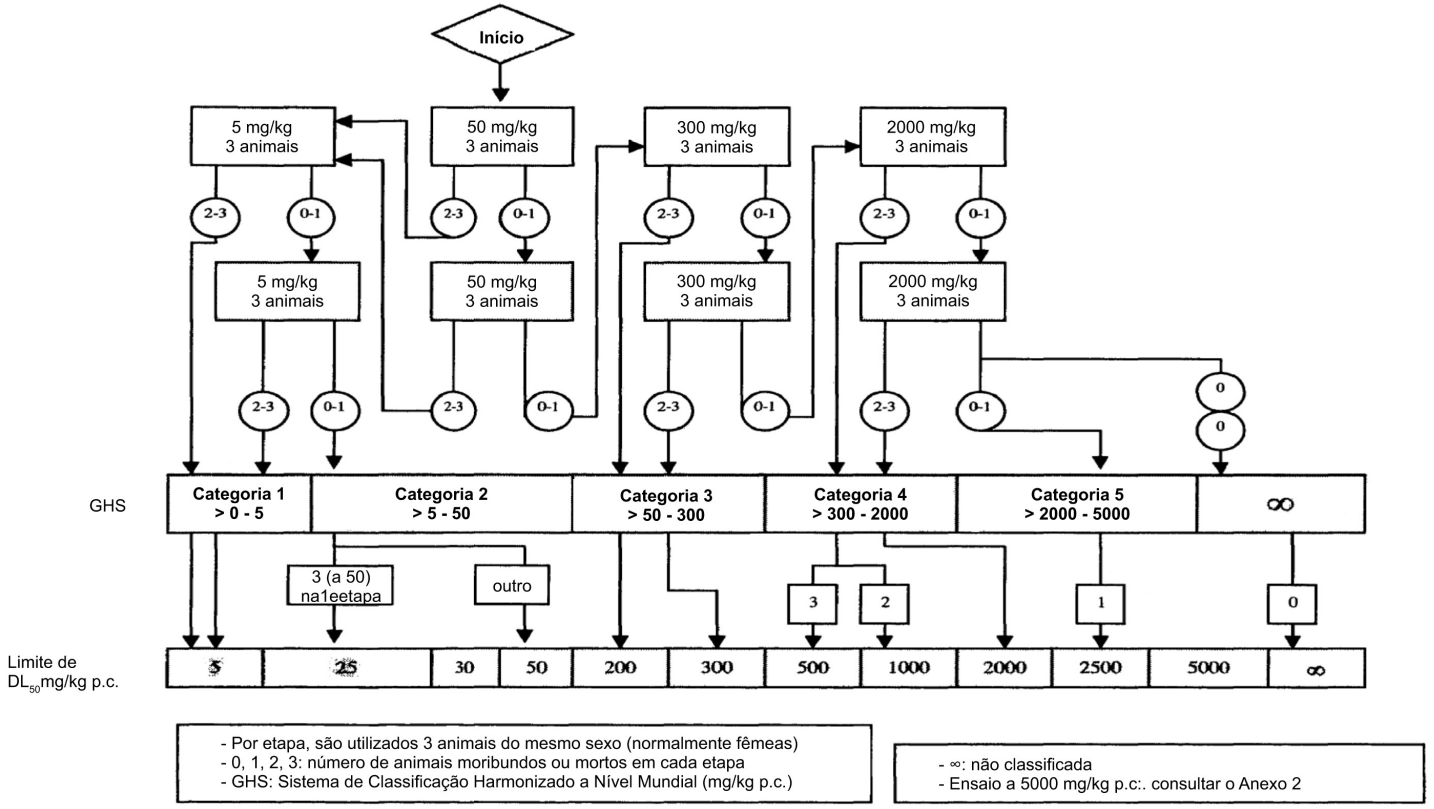
ANEXO 1

A PROCEDIMENTO DE ENSAIO COM UMA DOSE INICIAL DE 5 MG/KG DE PESO CORPORAL



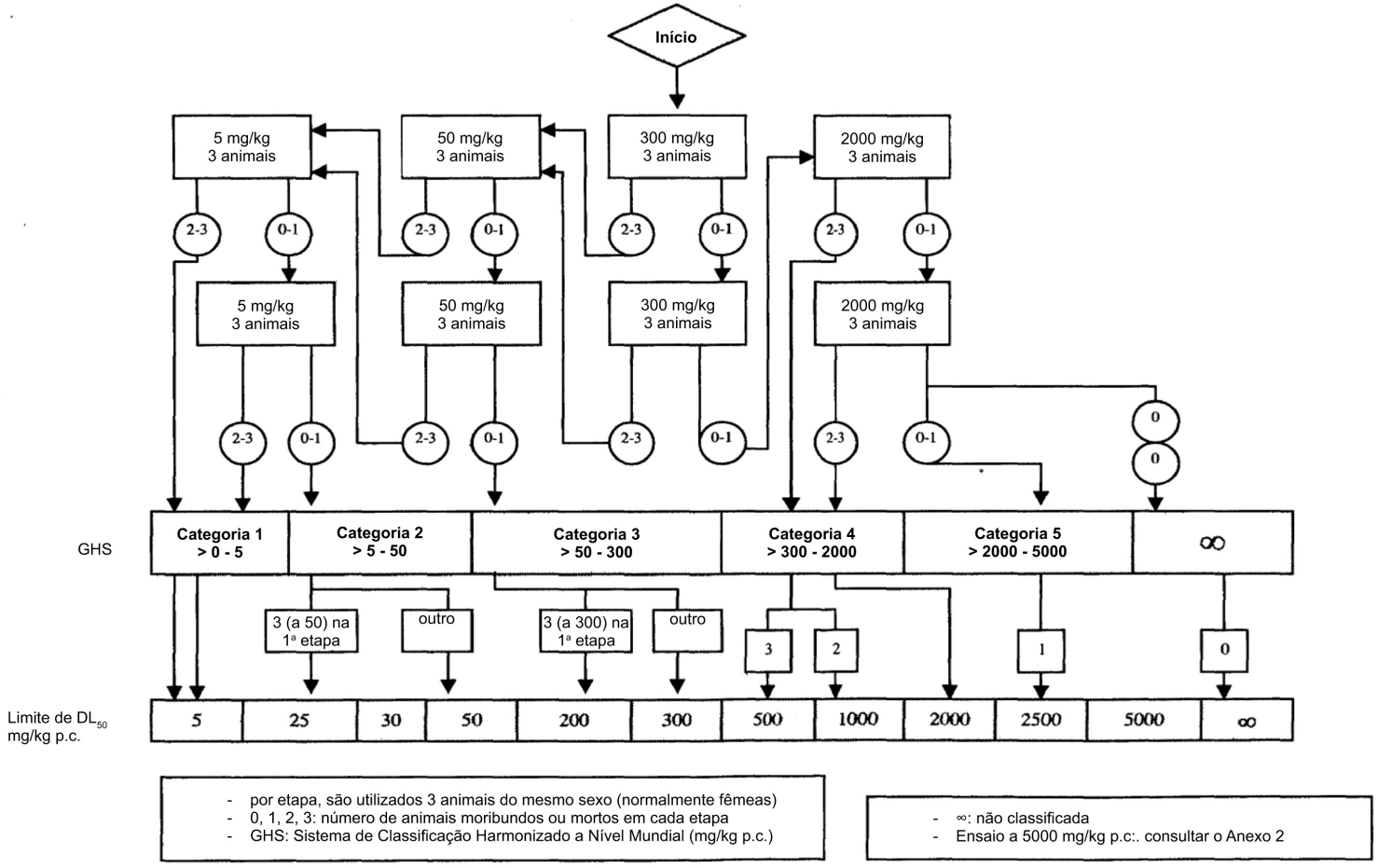
ANEXO 1 B

PROCEDIMENTO DE ENSAIO COM UMA DOSE INICIAL DE 50 MG/KG DE PESO CORPORAL



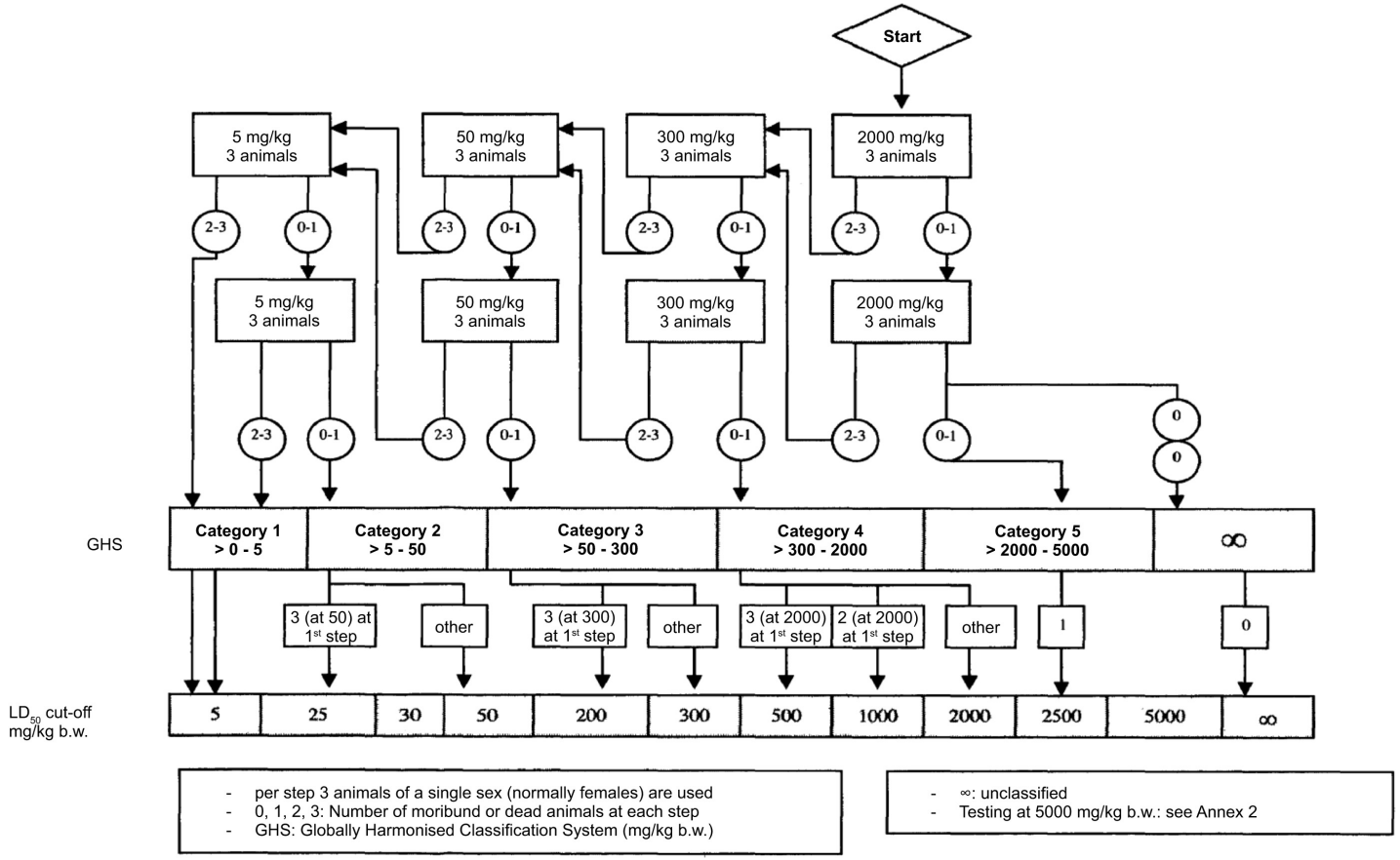
ANEXO 1 C

PROCEDIMENTO DE ENSAIO COM UMA DOSE INICIAL DE 300 MG/KG DE PESO CORPORAL



ANEXO 1 D

PROCEDIMENTO DE ENSAIO COM UMA DOSE INICIAL DE 2 000 MG/KG DE PESO CORPORAL



▼B

ANEXO 2

CRITÉRIOS PARA A CLASSIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS DE ENSAIO COM VALORES PREVISÍVEIS DE DL_{50} SUPERIORES A 2 000 MG/KG SEM NECESSIDADE DE EFECTUAR ENSAIO

Os critérios para a Categoria de Perigosidade 5 destinam-se a permitir a identificação de substâncias de ensaio que representam um perigo de toxicidade aguda relativamente baixo, mas que, em certas circunstâncias, podem representar perigo para populações vulneráveis. É previsível que tais substâncias apresentem valores de DL_{50} por via oral ou dérmica na gama de 2 000-5 000 mg/kg ou dose equivalente para outras vias. As substâncias de ensaio podem ser classificadas na categoria de perigosidade definida por: 2 000 mg/kg < DL_{50} < 5 000 mg/kg (Categoria 5 do GHS) nos seguintes casos:

a) se classificadas nesta categoria por qualquer dos esquemas de ensaio do anexo 1a-1d, baseados nas incidências de mortalidade;

b) se existir prova fiável indicativa de que os valores de DL_{50} se encontram na gama correspondente à Categoria 5 ou se outros estudos em animais ou sobre efeitos de toxicidade em seres humanos forem indicativos de preocupação acentuada em relação à salvaguarda da saúde humana;

c) através de extrapolação, estimativa ou medição de dados, desde que não seja garantida a atribuição a uma classe mais perigosa, e

   — quando existe informação fiável indicativa de efeitos de toxicidade significativos em seres humanos, ou

   — quando não é registada mortalidade nos ensaios por via oral até doses correspondentes aos valores para a Categoria 4, ou

   — quando o perito é de opinião de que não se verificam sintomas clínicos de toxicidade significativos para ensaios até doses com valores correspondentes à Categoria 4, com excepção de diarreia, erecção pilosa ou má aparência, ou

   — nos casos em que o perito confirme a existência de informação fiável, proveniente de outros estudos em animais que seja indicativa da existência de potenciais efeitos agudos significativos.

ENSAIOS COM DOSES SUPERIORES A 2 000 MG/KG

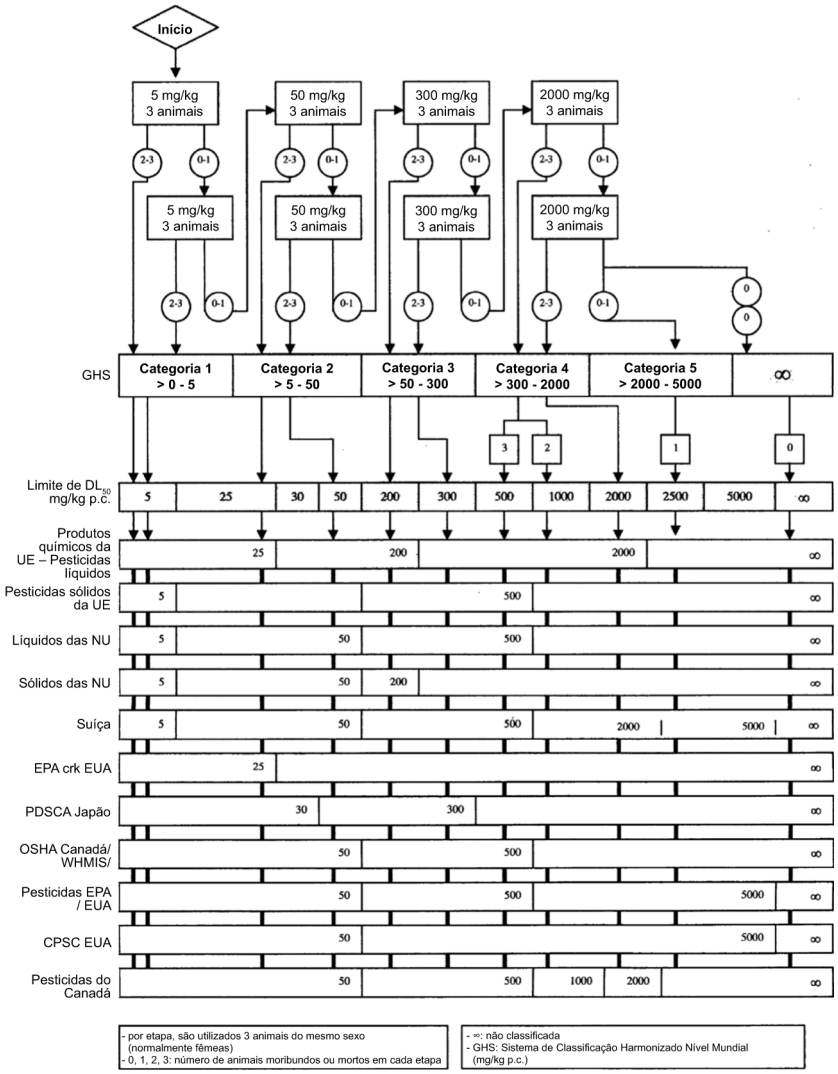
Devido ao reconhecimento da necessidade de proteger o bem-estar dos animais, os ensaios de animais na Categoria 5 (5 000 mg/kg) são desencorajados e só devem ser considerados no caso de ser muito provável que os resultados desse ensaio tenham especial relevância para a protecção da saúde humana ou animal (10). Não devem ser efectuados ensaios a doses superiores.

Quando é necessário efectuar o ensaio com uma dose de 5 000 mg/kg, só é necessária uma etapa (ou seja, três animais). Se o primeiro animal tratado morre, o ensaio prossegue a uma dose de 2 000 mg/kg, em conformidade com os fluxogramas do anexo 1. Se o primeiro animal sobrevive, são tratados dois outros animais. Se somente um dos três animais morrer, é de prever que o valor de DL_{50} seja superior a 5 000 mg/kg. Se ambos os animais morrerem, o ensaio prossegue com uma dose de 2 000 mg/kg.

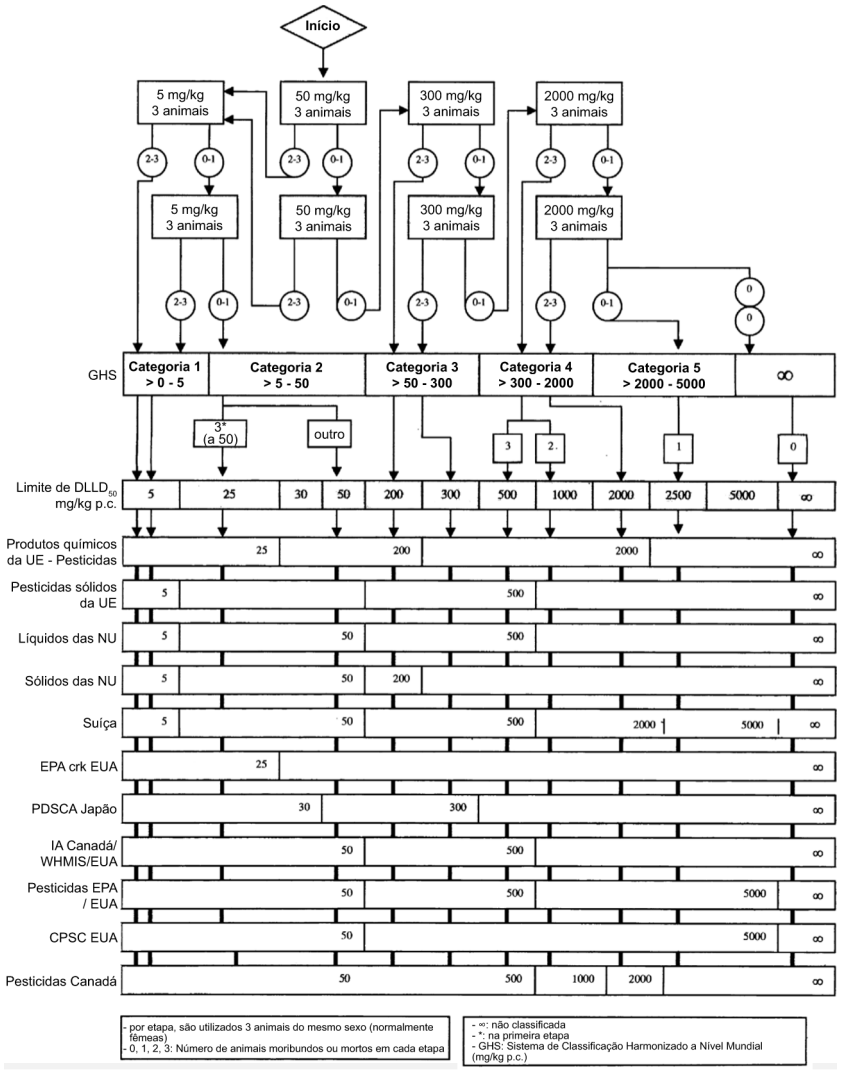
▼B

ANEXO 3

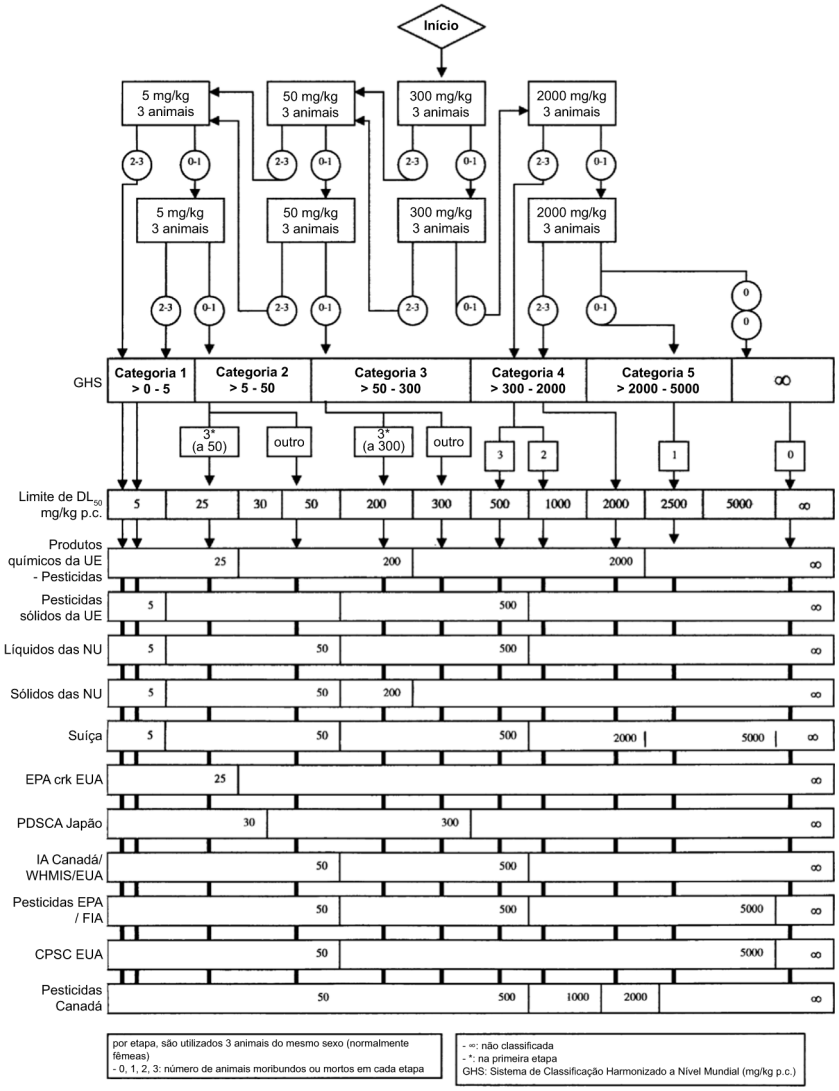
MÉTODO DE ENSAIO B.l.tris: Orientações sobre a classificação em conformidade com o esquema transitório da UE em vigor até à implementação total do Sistema de Classificação Harmonizado a Nível Mundial (GHS) [obtido da referência (8)]



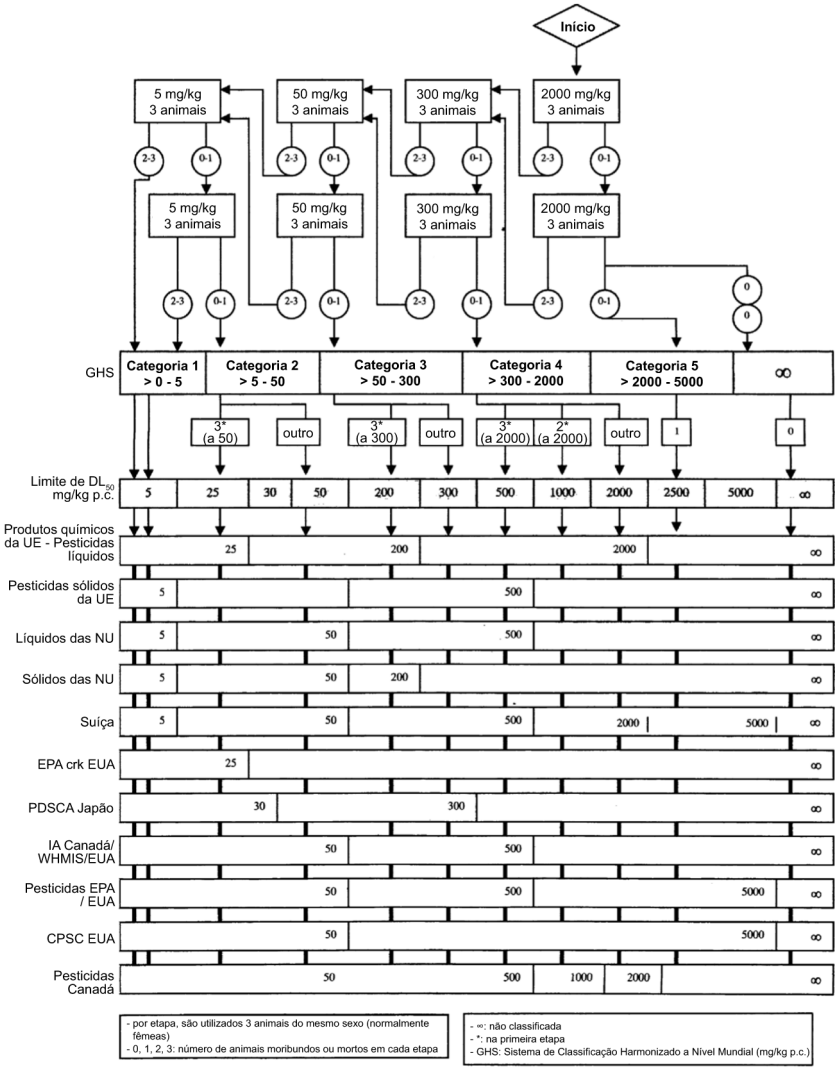
▼B


Início
5 mg/kg 3 animais
50 mg/kg 3 animais
300 mg/kg 3 animais
2000 mg/kg 3 animais
2-3
0-1
0
GHS
Categoria 1 > 0 - 5
Categoria 2 > 5 - 50
Categoria 3 > 50 - 300
Categoria 4 > 300 - 2000
Categoria 5 > 2000 - 5000
∞
3* (a 50)
outro
Limite de DLLD50 mg/kg p.c.
5
25
30
50
200
300
500
1000
2000
2500
5000
Produtos químicos da UE - Pesticidas
Pesticidas sólidos da UE
Líquidos das NU
Sólidos das NU
Suíça
EPA crk EUA
PDSCA Japão
IA Canadá/ WHMIS/EUA
Pesticidas EPA / EUA
CPSC EUA
Pesticidas Canadá
- por etapa, são utilizados 3 animais do mesmo sexo (normalmente fêmeas)
- 0, 1, 2, 3: Número de animais moribundos ou mortos em cada etapa
- ∞: não classificada
- *: na primeira etapa
- GHS: Sistema de Classificação Harmonizado a Nível Mundial (mg/kg p.c.)

▼B


Início
5 mg/kg 3 animais
50 mg/kg 3 animais
300 mg/kg 3 animais
2000 mg/kg 3 animais
2-3
0-1
0
GHS
Categoria 1 > 0 - 5
Categoria 2 > 5 - 50
Categoria 3 > 50 - 300
Categoria 4 > 300 - 2000
Categoria 5 > 2000 - 5000
∞
3* (a 50)
outro
3* (a 300)
3
2
1
Limite de DL50 mg/kg p.c.
5 25 30 50 200 300 500 1000 2000 2500 5000 ∞
Produtos químicos da UE - Pesticidas
Pesticidas sólidos da UE
Líquidos das NU
Sólidos das NU
Suíça
EPA crk EUA
PDSCA Japão
IA Canadá/ WHMIS/EUA
Pesticidas EPA / FIA
CPSC EUA
Pesticidas Canadá
por etapa, são utilizados 3 animais do mesmo sexo (normalmente fêmeas)
- 0, 1, 2, 3: número de animais moribundos ou mortos em cada etapa
- ∞: não classificada
- *: na primeira etapa
GHS: Sistema de Classificação Harmonizado a Nível Mundial (mg/kg p.c.)

▼B


Início
5 mg/kg 3 animais
50 mg/kg 3 animais
300 mg/kg 3 animais
2000 mg/kg 3 animais
2-3
0-1
0
GHS
Categoria 1 > 0 - 5
Categoria 2 > 5 - 50
Categoria 3 > 50 - 300
Categoria 4 > 300 - 2000
Categoria 5 > 2000 - 5000
∞
3* (a 50)
outro
3* (a 300)
3* (a 2000)
2* (a 2000)
1
Limite de DL50 mg/kg p.c.
5 25 30 50 200 300 500 1000 2000 2500 5000 ∞
Produtos químicos da UE - Pesticidas líquidos
Pesticidas sólidos da UE
Líquidos das NU
Sólidos das NU
Suíça
EPA crk EUA
PDSCA Japão
IA Canadá/ WHMIS/EUA
Pesticidas EPA / EUA
CPSC EUA
Pesticidas Canadá
- por etapa, são utilizados 3 animais do mesmo sexo (normalmente fêmeas)
- 0, 1, 2, 3: número de animais moribundos ou mortos em cada etapa
- ∞: não classificada
- *: na primeira etapa
- GHS: Sistema de Classificação Harmonizado a Nível Mundial (mg/kg p.c.)

▼M4

B.2. TOXICIDADE AGUDA POR INALAÇÃO

INTRODUÇÃO

1. Este método é equivalente ao *Test Guideline* 403 (2009) da OCDE (1). O *Test Guideline* 403 (TG 403) inicial relativo à toxicidade aguda por inalação foi adotado em 1981. Este método B.2 revisto (equivalente à versão revista do *Test Guideline* 403) visa maior flexibilidade, reduzir a utilização de animais e responder às exigências da regulamentação. Compreende dois tipos de estudos: um protocolo tradicional para determinação da CL_{50} e um protocolo de concentração em função do tempo (C × t). As principais características deste método são a capacidade de estabelecer uma relação de resposta à concentração na gama letal e não letal, tendo em vista o cálculo da mediana da concentração letal (CL_{50}), do limiar da concentração não letal (por exemplo, CL01) e do declive, bem como a capacidade de determinar se algum dos sexos tem maior sensibilidade. Deve recorrer-se ao protocolo C × t quando a regulamentação aplicável ou critérios científicos exigem o ensaio em animais durante vários períodos, nomeadamente para efeitos de planeamento da resposta a situações de emergência – por exemplo, para determinação de níveis-guia de exposição aguda (AEGL), estabelecimento de orientações destinadas ao planeamento da resposta a situações de emergência ou cálculo de limiares de exposição aguda – ou de ordenamento do território.

2. O *Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing* (GD 39) (2) contém orientações para a realização e interpretação dos estudos previstos neste método de ensaio.

3. No final do capítulo e no referido GD 39 (2) são definidos alguns conceitos utilizados neste método.

4. Este método permite caracterizar produtos químicos, avaliar quantitativamente os riscos correspondentes e escaloná-los e classificá-los de acordo com o Regulamento (CE) n.º 1272/2008 (3). O documento GD 39 (2) fornece orientações para a escolha do método adequado para o ensaio de efeitos agudos. Quando apenas são necessárias informações relativas à classificação e à rotulagem, o método normalmente recomendado é o do capítulo B.52 (4) deste anexo [ver o GD 39 (2)]. O método B.2 não se destina especificamente ao ensaio de materiais especiais, tais como matérias fibrosas ou isométricas pouco solúveis ou nanomateriais manufaturados.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

5. Antes de proceder a ensaios segundo este método, o laboratório deve ter em conta os elementos disponíveis sobre o produto químico, nomeadamente estudos já efetuados [por exemplo, com base no capítulo B.52 (4) deste anexo] cujos resultados eventualmente dispensem a realização de mais ensaios, a fim de minimizar a utilização de animais. Entre os elementos úteis para a escolha da espécie, da estirpe, do sexo, do modo de exposição e das concentrações mais adequados contam-se a identidade, a estrutura química e as propriedades físico-químicas do produto químico em estudo, resultados de ensaios de toxicidade *in vitro* ou *in vivo*, as utilizações previstas, o potencial de exposição humana e dados (Q)SAR – "(*quantitative) structure-activity relationships*", relações (quantitativas) estrutura/atividade – e toxicológicos disponíveis sobre substâncias estruturalmente afins [ver o GD 39 (2)].

▼M4

6. Deve evitar-se o mais possível ensaiar produtos químicos corrosivos e/ou irritantes a concentrações que presumivelmente causarão dor e/ou sofrimento intensos. Para determinar se é possível renunciar a mais ensaios, deve avaliar-se o potencial corrosivo/irritante segundo critérios de especialistas na matéria, designadamente com base em elementos relativos a experiências em pessoas ou animais (por exemplo, provenientes de estudos de dose repetida realizados a concentrações não corrosivas/não irritantes), em dados *in vitro* [por exemplo, provenientes da aplicação dos métodos descritos nos capítulos B.40 (5) ou B.40.A (6) deste anexo ou do *Test Guideline 435* da OCDE (7)], em valores de pH, em informações relativas a substâncias similares ou noutros dados pertinentes. Para determinadas necessidades impostas pela regulamentação (por exemplo, fins de planeamento para situações de emergência), pode recorrer-se a este método para expor animais a matérias com essas características, pois o método permite ao diretor ou ao investigador principal do estudo gerir a escolha das concentrações visadas. Estas não devem induzir irritação/corrosão acentuada, mas devem ser suficientes para que a curva de resposta à concentração abranja os níveis correspondentes aos objetivos do ensaio, nos planos científico e da regulamentação. É necessário justificar as concentrações escolhidas em cada caso [ver o GD 39 (2)].

PRINCÍPIO DO MÉTODO

7. O método B.2 revisto visa obter informações suficientes sobre a toxicidade aguda de produtos químicos, a fim de permitir classificá-los e de obter os dados de letalidade (por exemplo, CL_{50}, CL_{01} e declive) para um ou ambos os sexos necessários à avaliação quantitativa dos riscos. O método contempla duas possibilidades. A primeira é um protocolo tradicional, no qual se expõem grupos de animais a uma concentração-limite (ensaio do limite) ou a uma série de concentrações gradualmente mais elevadas durante um período predeterminado, normalmente quatro horas. Por razões ligadas à regulamentação aplicável, a duração da exposição pode ser diferente. A segunda possibilidade é um protocolo $C \times t$, no qual se expõem grupos de animais a uma só concentração (concentração-limite), ou a uma série de concentrações, durante períodos variáveis.

8. Os animais moribundos ou que apresentem sinais óbvios de dor ou de grande sofrimento continuado devem ser eutanasiados e, na interpretação dos resultados do ensaio, ser considerados do mesmo modo que os animais que morrem no ensaio. O documento de orientações n.º 19 da OCDE, relativo aos parâmetros eticamente mensuráveis (8), define os critérios que devem presidir à decisão de eutanasiar animais moribundos ou em grande sofrimento, bem como orientações sobre o reconhecimento da morte previsível ou iminente.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Escolha da espécie animal

9. Devem ser utilizados animais adultos, jovens e saudáveis de estirpes laboratoriais correntes. A espécie preferida é o rato. É necessário justificar a utilização de outras espécies.

Preparação dos animais

10. As fêmeas utilizadas devem ser nulíparas e não podem estar grávidas. No dia da exposição, os animais devem ser adultos jovens com oito a 12 semanas, de peso corporal não desviado mais de 20 % do peso médio correspondente a cada sexo dos animais da mesma idade anteriormente expostos. Os animais devem ser selecionados aleatoriamente e marcados para identificação individual. Para aclimatação às condições laboratoriais, devem permanecer nas gaiolas durante, pelo menos, cinco dias antes do início do ensaio. Durante um curto período antes do ensaio, também devem ser aclimatados ao dispositivo de ensaio, para diminuir a tensão causada por um ambiente novo.

▼M4

Manutenção dos animais

11. A temperatura do biotério deve ser de 22 °C ± 3 °C. O ideal será manter a humidade relativa entre 30 % e 70 %, embora isto possa não ser possível ao utilizar água como veículo. Antes e depois das exposições, os animais são geralmente engaiolados por sexo e por concentração, mas o número de animais por gaiola não deve dificultar a clara observação de cada animal e deve minimizar as perdas devidas a lutas ou canibalismo. Quando se opta pela exposição unicamente nasal dos animais, pode ser necessário aclimatá-los aos tubos de contenção. Estes não devem provocar aos animais tensões físicas, térmicas ou dinâmicas excessivas. A contenção dos animais pode afetar parâmetros fisiológicos como a temperatura corporal (hipertermia) e/ou o volume respirado por minuto. Caso se disponha de dados genéricos reveladores de que nenhuma destas alterações ocorre em grau apreciável, não será necessária a preadaptação aos tubos de contenção. Os animais cujo corpo seja exposto na totalidade a um aerossol devem permanecer em gaiolas individuais durante a exposição, para evitar que o aerossol seja filtrado pela pelagem dos que com eles coabitem. Exceto nos períodos de exposição, podem utilizar-se dietas convencionais certificadas de laboratório, com fornecimento ilimitado de água potável da rede pública. A iluminação deve ser artificial, com uma sequência de 12 horas de luz seguidas de 12 horas de escuridão.

Câmaras de inalação

12. Ao escolher-se a câmara de inalação, deve ter-se em conta a natureza do produto químico em estudo e o objetivo do ensaio. Privilegia-se o modo de exposição unicamente nasal, termo que abrange as exposições "unicamente da cabeça", "unicamente do nariz" e "unicamente do focinho". A exposição unicamente nasal é geralmente preferida no estudo de aerossóis de líquidos ou de sólidos, ou de vapores que possam condensar-se e formar aerossóis. Para determinados objetivos do estudo, poderá ser melhor recorrer ao modo de exposição do corpo inteiro, mas será necessário justificá-lo no relatório. Para garantir estabilidade atmosférica nas câmaras de corpo inteiro, o volume de todos os animais presentes em cada câmara não deve exceder 5 % do volume da câmara. O documento GD 39 (2) descreve os princípios, vantagens e desvantagens das técnicas de exposição unicamente nasal e do corpo inteiro.

CONDIÇÕES DE EXPOSIÇÃO

Administração das concentrações

13. As exposições unicamente nasais de ratos podem durar até seis horas. As exposições unicamente nasais de ratinhos geralmente não vão além de quatro horas. Caso sejam necessários estudos mais longos, é necessário justificá-lo [ver o GD 39 (2)]. Os animais expostos a aerossóis em câmaras de corpo inteiro devem ser alojados individualmente, para evitar que animais coabitantes ingiram o produto químico em estudo ao lamberem-se uns aos outros. Durante o período de exposição, a alimentação deve ser suspensa. Durante as exposições do corpo inteiro pode continuar a fornecer-se água.

14. Os animais são expostos ao produto químico em estudo sob a forma de gás, vapor, aerossol ou de uma mistura destes. O estado físico a ensaiar depende das propriedades físico-químicas do produto químico em estudo, da concentração escolhida e/ou da forma física cuja probabilidade de presença durante a manipulação e utilização do mesmo seja maior. Os produtos químicos higroscópicos ou quimicamente reativos devem ser ensaiados em atmosfera seca. Devem tomar-se precauções para evitar concentrações que possam provocar explosões.

▼M4

Distribuição granulométrica

15. Os aerossóis e os vapores que possam condensar-se em aerossóis devem ser objeto de análise granulométrica. Para que todas as zonas pertinentes do aparelho respiratório sejam expostas, recomenda-se a utilização de aerossóis com diâmetro aerodinâmico mediano da massa (MMAD) compreendido entre 1 μm e 4 μm e desvio-padrão geométrico (σ_g) compreendido entre 1,5 e 3,0 (2)(9)(10). Deve fazer-se o razoavelmente possível para respeitar estas condições, sendo necessário um parecer especializado caso isso não se consiga. Por exemplo, as partículas dos fumos metálicos podem ser mais pequenas do que o limite inferior indicado, ao passo que as partículas carregadas, as fibras e as matérias higroscópicas (que aumentam de volume no ambiente húmido do aparelho respiratório) podem exceder o limite superior.

Incorporação do produto químico em estudo num veículo

16. Pode utilizar-se um veículo para obter a concentração e a granulometria adequadas do produto químico na atmosfera. Regra geral, deve preferir-se a água. As matérias em partículas podem ser sujeitas a processos mecânicos destinados a obter a distribuição granulométrica necessária, mas tendo o cuidado de não decompor nem alterar o produto químico em estudo. Quando houver indícios de que um processo mecânico possa ter alterado a composição do produto químico em estudo (por exemplo, devido às altas temperaturas geradas pela fricção numa moagem excessiva), será necessário verificá-la por meios analíticos. Devem tomar-se as precauções adequadas para não contaminar o produto químico em estudo. Não é necessário ensaiar matérias granulosas não friáveis intencionalmente formuladas para não serem inaláveis. Para demonstrar que a manipulação de uma matéria granulosa não gera partículas respiráveis, efetua-se um ensaio de desgaste. Se este gerar substâncias respiráveis, deve realizar-se um ensaio de toxicidade por inalação.

Animais de controlo

17. Não é necessário um grupo de controlo negativo (do ar) em paralelo. Caso se utilize um veículo diverso da água para gerar a atmosfera a ensaiar, só se utilizará um grupo de controlo do veículo se não se dispuser de dados históricos de toxicidade por inalação. Se um estudo de toxicidade de um produto químico incorporado num determinado veículo não revelar toxicidade, conclui-se que o veículo em causa não é tóxico à concentração ensaiada, não sendo necessário nenhum grupo de controlo do veículo.

MONITORIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXPOSIÇÃO

Caudal de ar nas câmaras

18. Durante cada exposição, é necessário regular cuidadosamente, monitorizar continuamente e registar pelo menos de hora a hora o caudal de ar através de cada câmara. A monitorização da concentração (ou estabilidade) da atmosfera em estudo constitui uma medida permanente de todos os parâmetros dinâmicos e um meio indireto de regular os que intervêm na geração da atmosfera em estudo. É necessário ter especial cuidado em evitar reinalações nas câmaras de exposição unicamente nasal, evitando que o fluxo de ar através do sistema de exposição seja incapaz de produzir uma circulação dinâmica da atmosfera que contém o produto químico em estudo. Existem metodologias a que pode recorrer-se para demonstrar que não ocorrem reinalações nas condições experimentais escolhidas (2)(11). A concentração de oxigénio não deve ser inferior a 19 % e a concentração de dióxido de carbono não deve exceder 1 %. Se houver razões para crer que estas concentrações não são respeitadas, é necessário medi-las.

▼M4

Temperatura e humidade relativa nas câmaras

19. Deve manter-se a temperatura nas câmaras a 22 °C ± 3 °C. Tanto no caso das exposições unicamente nasais como das exposições do corpo inteiro, é necessário monitorizar a humidade relativa na zona de respiração dos animais e registá-la pelo menos três vezes (duração do ensaio até quatro horas) ou de hora a hora (durações mais curtas). O ideal seria manter a humidade relativa entre 30 % e 70 %, mas isso pode não ser possível – por exemplo, quando se estudam misturas aquosas – ou pode não ser mensurável (devido a interferências do produto químico em estudo com o método de ensaio).

Concentração nominal do produto químico em estudo

20. Sempre que possível, deve calcular-se e registar-se a concentração nominal na câmara de exposição. Esta é dada pela divisão da massa gerada do produto químico em estudo pelo volume de ar total que circulou pelo sistema da câmara. A concentração nominal não é utilizada para caracterizar a exposição dos animais, mas a sua comparação com a concentração real dá uma indicação da eficácia de geração do sistema de ensaio, podendo ser utilizada para detetar problemas a esse nível.

Concentração real do produto químico em estudo

21. Entende-se por "concentração real do produto químico em estudo", a concentração do produto químico na zona de respiração dos animais da câmara de inalação. As concentrações reais podem determinar-se por métodos específicos (por exemplo, amostragem direta ou métodos de adsorção ou de reação química e posterior caracterização analítica) ou por métodos inespecíficos, tais como gravimetria após filtração. O método gravimétrico só é aceitável para aerossóis de pós com um único componente ou de líquidos pouco voláteis e deve apoiar-se em caracterizações adequadas específicas do produto químico em causa efetuadas antes da realização do estudo. A concentração de aerossóis de pós com vários componentes também pode determinar-se por gravimetria. Todavia, são necessários para isso dados analíticos que demonstrem que a composição do produto transportado no aerossol é semelhante à do produto inicial. Se não se dispuser desses dados, pode ser necessário reanalisar periodicamente o produto químico em estudo (idealmente no aerossol) durante o ensaio. No caso dos agentes aerossolizados que possam evaporar-se ou sublimar, é necessário demonstrar que todas as fases são recolhidas pelo método escolhido. As concentrações visadas, nominais e reais devem figurar no relatório do estudo, mas apenas as concentrações reais são utilizadas na análise estatística para cálculo dos valores letais de concentração.

22. Deve utilizar-se, se possível, apenas um lote do produto químico em estudo e a amostra em estudo deve ser conservada em condições que preservem a sua pureza, homogeneidade e estabilidade. Antes de iniciar o estudo, deve caracterizar-se o produto químico em causa no que respeita à sua pureza e, se tecnicamente viável, à sua identidade e às quantidades dos contaminantes e impurezas nele identificados. Para o efeito, pode recorrer-se, entre outros, a tempos de retenção e áreas relativa de picos, pesos moleculares obtidos por espetrometria de massa ou cromatografia em fase gasosa ou outras estimativas. Embora a identidade da amostra a estudar não seja da responsabilidade do laboratório, pode ser aconselhável que este confirme, pelo menos, alguns aspetos da caracterização efetuada pelo cliente (cor, natureza física, etc.).

23. Deve manter-se a atmosfera de exposição tão constante quanto possível e proceder-se à sua monitorização continuamente e/ou intermitentemente, consoante o método de análise. Caso se proceda a uma colheita de amostras intermitente, num estudo de quatro horas deve recolher-se uma amostra da atmosfera da câmara pelo menos duas vezes. Se, isso não for viável, por limitações relacionadas com o caudal de ar ou devido a concentrações baixas, pode colher-se uma amostra ao longo de todo o período de exposição. Se ocorrerem variações pronunciadas de uma amostra para outra, devem colher-se quatro amostras por exposição nas concentrações seguintes. A

▼M4

concentração na câmara correspondente a uma determinada amostra não deve desviar-se da concentração média mais de 10 %, no caso de gases e vapores, nem mais de 20 %, no caso de aerossóis de líquidos ou de sólidos. Deve calcular-se e registar-se o tempo necessário para a câmara atingir o equilíbrio (t_{95}). A duração da exposição corresponde ao tempo de geração do produto químico em estudo, incluído o tempo necessário para atingir t_{95}. O documento GD 39 (2) contém orientações para a estimativa do t_{95}.

24. No caso de misturas muito complexas de gases ou vapores e de aerossóis (por exemplo, atmosferas de combustão e produtos químicos gerados por produtos ou dispositivos finais específicos), o comportamento de cada fase na câmara de inalação pode ser diferente. Por esse motivo, deve escolher-se em cada fase (gás ou vapor e aerossol) pelo menos uma substância indicadora (substância analisada), normalmente a principal substância ativa da mistura. Se o produto químico em estudo for uma mistura, deve indicar-se no relatório a concentração analítica correspondente à mistura e não apenas a concentração correspondente à substância ativa ou ao componente (substância analisada) em causa. O documento GD 39 (2) contém mais informações sobre as concentrações reais.

Distribuição granulométrica do produto químico em estudo

25. Deve determinar-se a distribuição granulométrica dos aerossóis pelo menos duas vezes durante cada exposição de quatro horas, recorrendo a um impactor de cascata ou a outro instrumento, tal como um granulómetro aerodinâmico. Se for possível demonstrar a equivalência dos resultados obtidos pelo impactor de cascata e pelo instrumento alternativo, pode utilizar-se este último em todo o estudo. Em paralelo ao instrumento primário, deve utilizar-se um segundo dispositivo, tal como um filtro gravimétrico ou um borbulhador de gás/impactor *impinger*, para confirmar a eficiência de captação do primeiro. As concentrações mássicas obtidas por análise granulométrica e por análise com filtros não devem diferir entre si mais do que valores razoáveis [ver o GD 39 (2)]. Se for possível demonstrar esta equivalência no início do estudo, não é necessário efetuar mais medições de confirmação. Por razões de bem-estar animal, devem ser tomadas medidas para minimizar dados inconclusivos que possam obrigar à repetição de exposições. É necessário efetuar uma análise granulométrica no caso dos vapores que possam condensar-se para formar aerossóis ou se forem detetadas partículas numa atmosfera de vapores suscetível de formar fases mistas (ver o ponto 15).

PROCEDIMENTO

26. São descritos a seguir dois tipos de estudo: o protocolo tradicional e o protocolo C × t. Ambos podem compreender um estudo preliminar, um estudo principal e/ou um ensaio do limite (no protocolo tradicional) ou um ensaio a uma concentração-limite (C × t). Se um dos sexos for reconhecidamente mais sensível, fica ao critério do diretor do estudo efetuar estes estudos apenas a esse sexo. Se espécies que não o rato forem sujeitas a exposição unicamente nasal, pode ajustar-se a duração máxima da exposição para minimizar a tensão gerada na espécie em causa. Antes de iniciar o estudo deve atender-se a todos os dados disponíveis, a fim de minimizar a utilização de animais. Por exemplo, os dados gerados em aplicação do capítulo B.52 (4) deste anexo podem dispensar o estudo preliminar e servir para verificar se um dos sexos é mais sensível que o outro [ver o GD 39 (2)].

▼M4

PROTOCOLO TRADICIONAL

Considerações gerais: protocolo tradicional

27. No estudo tradicional, expõem-se grupos de animais ao produto químico em estudo, durante um período fixo (geralmente quatro horas), numa câmara de exposição unicamente nasal ou de corpo inteiro. Os animais são expostos a uma concentração-limite (ensaio do limite) ou, num processo sequencial, a, pelo menos, três concentrações (estudo principal). O estudo principal pode ser antecedido de um estudo preliminar, a menos que já se disponha de determinadas informações sobre o produto químico, tais como as provenientes de um estudo B.52 já realizado [ver o GD 39 (2)].

Estudo preliminar: protocolo tradicional

28. Recorre-se a um estudo preliminar para estimar a potência do produto químico, identificar diferenças de sensibilidade entre sexos e facilitar a escolha dos níveis de concentração de exposição para o estudo principal ou o ensaio do limite. Ao selecionar os níveis de concentração para o estudo preliminar, deve atender-se a todos os dados disponíveis, nomeadamente dados relativos a produtos químicos similares e dados (Q)SAR eventualmente disponíveis. A cada concentração, expõem-se, no máximo, três machos e três fêmeas (podem ser necessários três animais por sexo para determinar uma diferença de sensibilidade entre sexos). O estudo preliminar pode incidir apenas numa concentração, mas podem ser ensaiadas mais se for necessário. Neste estudo não devem ensaiar-se tantos animais e concentrações como num estudo principal. Em vez do estudo preliminar, pode recorrer-se a um estudo B.52 (4) efetuado anteriormente [ver o GD 39 (2)].

Ensaio do limite: protocolo tradicional

29. Efetua-se este ensaio caso se saiba ou preveja que o produto químico em estudo é praticamente não tóxico, isto é, só induzirá toxicidade acima da concentração-limite prevista na regulamentação aplicável. No ensaio do limite, expõe-se a uma concentração-limite do produto químico em estudo um único grupo de três machos e três fêmeas. Podem obter-se informações sobre a toxicidade do produto químico em estudo a partir de ensaios já realizados com produtos químicos semelhantes, tomando em consideração a identidade e percentagem dos componentes de importância toxicológica reconhecida. Nos casos em que se disponha de pouca ou nenhuma informação sobre a toxicidade do produto químico em estudo ou quando este for previsivelmente tóxico, deve efetuar-se o estudo principal.

30. A escolha das concentrações-limite depende geralmente da regulamentação aplicável. Quando se trata do Regulamento (CE) n.º 1272/2008, as concentrações-limite aplicáveis são 20 000 ppm para gases, 20 mg/l para vapores e 5 mg/l para aerossóis (ou a concentração máxima atingível) (3). Pode ser tecnicamente difícil gerar as concentrações-limite no caso de determinados produtos químicos, em especial quando se trata de vapores ou de aerossóis. Ao ensaiar aerossóis, o principal objetivo é conseguir obter partículas de dimensões respiráveis (MMAD compreendido entre 1 μm e 4 μm), o que, com a maior parte dos produtos químicos, se consegue a uma concentração de 2 mg/l. Só deve tentar-se ensaiar aerossóis a concentrações superiores a 2 mg/l se for possível gerar partículas de dimensões respiráveis [ver o GD 39 (2)]. Por razões de bem-estar animal, o Regulamento (CE) n.º 1272/2008 (3) desaconselha o ensaio de concentrações superiores à concentração-limite. Só importa ponderar o ensaio da concentração-limite se for elevada a probabilidade de os resultados desse ensaio terem interesse direto para a proteção da saúde humana (3), o que deve justificar-se no relatório do estudo. No caso de produtos químicos potencialmente explosivos, devem tomar-se precauções para evitar condições favoráveis à ocorrência de explosões. Para evitar a utilização desnecessária de animais, deve efetuar-se um ensaio sem animais antes do ensaio do limite, para verificar se é possível atingir as condições deste ensaio nas câmaras.

▼M4

31. Se a concentração-limite gerar mortalidade ou animais moribundos, os resultados do ensaio do limite podem servir de estudo preliminar para os ensaios seguintes a outras concentrações (ver o estudo principal). Se as propriedades físicas ou químicas do produto químico em estudo impossibilitarem que se atinja a concentração-limite, deve ensaiar-se a concentração máxima que se consiga atingir. Se a letalidade verificada à concentração máxima atingível for inferior a 50 %, não são necessários mais ensaios. Se não for possível atingir as concentrações-limite devem constar do relatório do estudo uma explicação disso e dados corroborantes. Se a concentração máxima atingível de um vapor não induzir toxicidade, pode ser necessário gerar o produto químico em estudo sob a forma de um aerossol de líquido.

Estudo principal: protocolo tradicional

32. Num estudo principal utilizam-se, normalmente, cinco machos e cinco fêmeas (ou cinco animais do sexo sensível, se for conhecido) por nível de concentração, sendo que o número mínimo de níveis é três. O número de níveis de concentração utilizado deve permitir efetuar uma análise estatística sólida. O intervalo de tempo entre a exposição dos diversos grupos é determinado pelo aparecimento, pela duração e pela intensidade dos sinais de toxicidade observados. Não se expõem animais ao nível de concentração seguinte enquanto não houver um grau razoável de confiança na sobrevivência dos últimos animais expostos. O diretor do estudo pode, então, ajustar a concentração visada para o próximo grupo a expor. Dada a dependência de tecnologias sofisticadas, este procedimento nem sempre será possível nos estudos por inalação, pelo que a exposição de animais ao nível de concentração seguinte deve basear-se na experiência adquirida e numa apreciação científica. Ao ensaiar misturas, deve consultar-se o documento GD 39 (2).

PROTOCOLO "CONCENTRAÇÃO EM FUNÇÃO DO TEMPO" (C × t)

Considerações gerais: Protocolo C × t

33. Na avaliação da toxicidade por inalação, um estudo sequencial C × t pode constituir alternativa ao protocolo tradicional (12)(13)(14). Neste método, Os animais são expostos durante diversos períodos a várias concentrações do produto químico em estudo. Todos os ensaios são efetuados numa câmara de exposição unicamente nasal, pois as câmaras de corpo inteiro não se prestam a este protocolo. O procedimento sequencial descrito no apêndice 1 ilustra este protocolo. Uma análise de simulação mostrou que tanto o protocolo tradicional como o protocolo C × t podem gerar valores fiáveis de CL_{50}, embora este último seja geralmente melhor para obter valores fiáveis de CL_{01} e CL_{10} (15).

34. Uma análise de simulação demonstrou que é geralmente adequado utilizar dois animais por ponto (C,t) – um animal de cada sexo, se forem utilizados ambos os sexos, ou dois animais do sexo mais sensível – para ensaiar quatro concentrações e cinco durações de exposição num estudo principal. Em certas circunstâncias, fica ao critério do diretor do estudo utilizar dois ratos de cada sexo em cada ponto (C,t) (15). A utilização de dois animais de cada sexo em cada ponto (C,t) pode reduzir os erros sistemáticos e a variabilidade das estimativas, aumentar a taxa de êxito destas últimas e melhorar a cobertura do intervalo de confiança. Todavia, se a correlação dos dados não for suficiente para possibilitar uma estimativa quando se utiliza um animal de cada sexo ou dois animais do sexo mais sensível, uma quinta concentração de exposição também poderá bastar para o efeito. Para mais orientações sobre o número de animais e as concentrações a utilizar num estudo C × t, consultar o documento GD 39 (2).

▼M4

Estudo preliminar: Protocolo C × t

35. Recorre-se a um estudo preliminar para estimar a potência do produto químico e facilitar a escolha dos níveis de concentração de exposição para o estudo principal. Para selecionar uma concentração inicial adequada para o estudo principal e minimizar o número de animais utilizados, pode ter de se efetuar um estudo preliminar com um máximo de três animais de cada sexo a cada concentração – mais elementos no apêndice III do documento GD 39 (2). Pode ser necessário utilizar três animais de cada sexo para determinar a diferença de sensibilidade entre sexos. Expõem-se estes animais durante um período único de, geralmente, 240 minutos. A viabilidade de se gerarem as atmosferas de ensaio adequadas deve ser avaliada em ensaios técnicos prévios realizados sem animais. Caso se disponha de dados de mortalidade obtidos num estudo B.52 (4), geralmente não é necessário efetuar um estudo preliminar. Para selecionar a concentração inicial visada num estudo B.2, o diretor do estudo deve atender aos perfis de mortalidade observados a todas as concentrações ensaiadas nos estudos B.52 (4) realizados com ambos os sexos de cujos resultados disponha [ver o GD 39 (2)].

Concentração inicial: protocolo C × t

36. A concentração inicial (sessão de exposição I no apêndice 1) é uma concentração-limite ou uma concentração escolhida pelo diretor do estudo com base no estudo preliminar. Expõem-se grupos de um animal de cada sexo a esta concentração durante diversos períodos (por exemplo, 15, 30, 60, 120 ou 240 minutos), num total de dez animais (sessão de exposição I no apêndice 1).

37. A escolha das concentrações-limite depende geralmente da regulamentação aplicável. Quando se trata do Regulamento (CE) n.º 1272/2008, as concentrações-limite aplicáveis são 20 000 ppm para gases, 20 mg/l para vapores e 5 mg/l para aerossóis (ou a concentração máxima atingível) (3). Pode ser tecnicamente difícil gerar as concentrações-limite no caso de determinados produtos químicos, em especial quando se trata de vapores ou de aerossóis. Ao ensaiar aerossóis, o objetivo é conseguir obter partículas de dimensões respiráveis (MMAD compreendido entre 1 μm e 4 μm) na concentração-limite de 2 mg/l, o que é possível no caso da maior parte dos produtos químicos. Só deve tentar-se ensaiar aerossóis a concentrações superiores a 2 mg/l se for possível gerar partículas de dimensões respiráveis [ver o GD 39 (2)]. Por razões de bem-estar animal, o Regulamento (CE) n.º 1272/2008 (3) desaconselha o ensaio de concentrações superiores à concentração-limite. Só importa ponderar ensaios a concentrações superiores a essa concentração se for elevada a probabilidade de os resultados desses ensaios terem interesse direto para a proteção da saúde humana (3), o que deve justificar-se no relatório do estudo. No caso de produtos químicos potencialmente explosivos, devem tomar-se precauções para evitar condições favoráveis à ocorrência de explosões. Para evitar a utilização desnecessária de animais, deve efetuar-se um ensaio sem animais antes de ensaiar a concentração inicial, para verificar se é possível atingir nas câmaras as condições correspondentes a essa concentração.

38. Se a concentração inicial gerar mortalidade ou animais moribundos, os resultados obtidos para esta concentração podem servir de ponto de partida para os ensaios seguintes a outras concentrações (ver o estudo principal). Se as propriedades físicas ou químicas do produto químico em estudo impossibilitarem que se atinja a concentração-limite, deve ensaiar-se a concentração máxima que se consiga atingir. Se a letalidade verificada à concentração máxima atingível for inferior a 50 %, não são necessários mais ensaios. Se não for possível atingir a concentração-limite, devem constar do relatório do estudo uma explicação disso e dados corroborantes. Se a concentração máxima atingível de um vapor não induzir toxicidade, pode ser necessário gerar o produto químico em estudo sob a forma de um aerossol de líquido.

▼M4

Estudo principal: protocolo C × t

39. A concentração inicial (sessão de exposição I no apêndice 1) ensaiada no estudo principal é uma concentração-limite ou uma concentração escolhida pelo diretor do estudo com base no estudo preliminar. Se for observada mortalidade durante ou após a sessão de exposição I, deve tomar-se a exposição mínima (C × t) que gera mortalidade como orientação para determinar a concentração e os períodos de exposição para a sessão de exposição II. Cada sessão de exposição subsequente dependerá da sessão que a precede (ver o apêndice 1).

40. No caso de muitos produtos químicos, os resultados obtidos para a concentração inicial, juntamente com os resultados obtidos em três sessões de exposição suplementares menos espaçadas (sendo este espaçamento dado pelo fator que define a série geométrica de períodos de exposição, geralmente $\sqrt{2}$) são suficientes para estabelecer a relação entre C × t e a mortalidade (15), mas pode ser vantajoso utilizar uma quinta concentração de exposição – ver o apêndice 1 e o documento GD 39 (2). O apêndice 1 explica o tratamento matemático dos resultados do protocolo C × t.

EXAMES

41. Os animais devem ser examinados clinicamente com frequência durante o período de exposição. Depois desta, deve efetuar-se um exame clínico pelo menos duas vezes no dia da exposição – ou mais vezes, quando a resposta dos animais à exposição o aconselhar – e pelo menos uma vez por dia em seguida, durante 14 dias. Não é fixada uma duração do período de observação, que deve depender da natureza e do momento do aparecimento de sinais clínicos, assim como da duração do período de recuperação. O momento do aparecimento e do desaparecimento dos sinais de toxicidade é importante, nomeadamente se houver uma certa demora na manifestação desses sinais. Todas as observações devem ser sistematicamente registadas, mantendo registos individuais para cada animal. Os animais moribundos ou que apresentem sinais de dor intensa e/ou de grande sofrimento continuado devem ser eutanasiados, por razões de bem-estar animal. No exame clínico de sinais de toxicidade, não devem confundir-se um mau aspeto inicial e alterações respiratórias passageiras, imputáveis ao procedimento de exposição, com sinais de toxicidade do produto químico em estudo passíveis de aconselhar a eutanásia prematura dos animais. Devem ser tidos em conta (7) os princípios e critérios resumidos no documento de orientações n.º 19 da OCDE (GD 19). Se forem eutanasiados animais ou forem encontrados animais mortos, deve registar-se o momento da morte com a maior exatidão possível.

42. Os exames a efetuar aos animais engaiolados devem incidir, nomeadamente, nas alterações da pele e da pelagem, dos olhos e das mucosas, do aparelho respiratório, do sistema circulatório, dos sistemas nervosos autónomo e central, da atividade somatomotora e do comportamento. Se possível, registar as diferenças eventualmente observadas entre efeitos locais e sistémicos. Deve estar-se atento a tremores, convulsões, salivação, diarreia, letargia, sono e coma. A medição da temperatura retal pode corroborar uma bradipneia reflexa ou uma hipo/hipertermia relacionadas com a exposição ou com o confinamento.

Peso corporal

43. Regista-se o peso de cada animal uma vez durante o período de aclimatação, no dia da exposição, antes desta (dia 0), e, pelo menos, nos dias 1, 3 e 7 (e posteriormente uma vez por semana), bem como no momento da morte ou da eutanásia, se posterior ao dia 1. O peso corporal é reconhecidamente um indicador crítico de toxicidade, pelo que é necessário observar atentamente os animais cujo peso decresça 20 % ou mais relativamente ao peso anterior ao estudo e não volte a aumentar. No final do período após a exposição, pesam-se e eutanasiam-se os animais sobreviventes.

▼M4

Patologia

44. Os animais utilizados nos ensaios (incluindo os que morrerem durante o ensaio ou que forem eutanasiados e retirados do estudo por razões de bem-estar animal) devem ser sujeitos a uma autópsia macroscópica. Se não for possível realizar a autópsia imediatamente depois de detetada a morte do animal, este deve ser refrigerado (não congelado) a uma temperatura suficientemente baixa para minimizar a autólise. As autópsias devem ser efetuadas o mais rapidamente possível, normalmente não mais de um ou dois dias após a morte. Regista-se todas as alterações patológicas macroscópicas de cada animal, prestando especial atenção às alterações do aparelho respiratório.

45. Podem ser efetuados outros exames previamente previstos para alargar o valor interpretativo do estudo, tais como a pesagem dos pulmões dos ratos sobreviventes e/ou a pesquisa, por exame microscópico, de irritações do aparelho respiratório. Também podem examinar-se os órgãos que evidenciem macropatologias de animais que tenham sobrevivido 24 horas ou mais, bem como órgãos que se saiba serem afetados ou que se preveja serem-no. O exame microscópico de todo o aparelho respiratório pode fornecer elementos úteis no caso dos produtos químicos que reagem com a água, tais como os ácidos e os produtos químicos higroscópicos.

DADOS E RELATÓRIOS

Dados

46. Devem ser indicados o peso corporal e os resultados da autópsia de cada animal. Devem ser resumidos os resultados dos exames clínicos num quadro, indicando, para cada grupo estudado, o número de animais utilizados, o número de animais que apresentaram sinais específicos de toxicidade, o número de animais que morreram durante o ensaio ou que foram eutanasiados e o momento da morte de cada animal, complementados por uma descrição dos efeitos tóxicos e da evolução e reversibilidade destes, bem como pelos resultados das autópsias.

Relatório dos ensaios

47. Elementos a constar, quando pertinente, do relatório dos ensaios:

Animais estudados e condições em que são mantidos

— descrição das condições de engaiolamento, nomeadamente: número (ou alteração do número) de animais por gaiola, camas, temperatura e humidade relativa ambientes, fotoperíodo e dieta,

— espécie e estirpe utilizadas e, caso não sejam utilizados ratos, justificação da utilização de outra espécie,

— número, idade e sexo,

— método de aleatorização,

— elementos sobre a qualidade dos alimentos e da água (incluindo o tipo de dieta e a origem desta, bem como a origem da água),

— descrição de eventuais condicionamentos anteriores ao ensaio, nomeadamente ao nível da dieta, de quarentenas e do tratamento de doenças.

▼**M4**

Produto químico em estudo

— natureza física, grau de pureza e propriedades físico-químicas pertinentes (incluindo a isomerização),

— dados de identificação e, se for conhecido, número de registo CAS (*Chemical Abstract Service*).

Veículo

— justificação da utilização e da escolha do veículo (se não for água),

— dados históricos ou paralelos demonstrativos de que o veículo não interfere nos resultados do estudo.

Câmaras de inalação

— descrição – incluindo dimensões e volume – das câmaras de inalação,

— origem e descrição do equipamento utilizado na exposição dos animais e na geração da atmosfera,

— equipamento de medição da temperatura, humidade, granulometria e concentração real,

— fonte de ar, tratamento do ar fornecido/evacuado e sistema de climatização utilizado,

— métodos utilizados para calibrar o equipamento a fim de garantir a homogeneidade da ensaiada,

— subpressão ou sobrepressão,

— pontos de exposição por câmara (de exposição unicamente nasal); localização dos animais no sistema (câmara de exposição de corpo inteiro),

— homogeneidade/estabilidade no tempo da atmosfera ensaiada,

— localização nas câmaras dos sensores térmicos e higrométricos e dos pontos de colheita de amostras da atmosfera ensaiada,

— caudais de ar, caudal de ar em cada ponto de exposição (exposição unicamente nasal) ou relação entre o volume ocupado pelos animais e o volume da câmara (câmaras de exposição de corpo inteiro),

— informações sobre o equipamento eventualmente utilizado para medir o oxigénio e o dióxido de carbono,

— tempo necessário para as câmaras de inalação atingirem o equilíbrio (t_{95}),

— número horário de substituições de volume,

— medidores (se existirem).

Elementos relativos à exposição

— fundamentação da escolha da concentração visada no estudo principal,

— concentrações nominais (dadas pela divisão da massa do produto químico em estudo introduzido na câmara de inalação pelo volume de ar total que nela circulou),

— concentrações reais do produto químico em estudo obtidas na zona de respiração dos animais; no caso das misturas que geram formas físicas heterogéneas (gases, vapores, aerossóis), pode analisar-se separadamente cada uma delas,

▼M4

— as concentrações no ar devem ser indicadas em unidades de massa (mg/l, mg/m^3, etc.), podem igualmente indicar-se unidades de volume (ppm, ppb, etc.) entre parêntesis,

— distribuição granulométrica, diâmetro aerodinâmico mediano da massa (MMAD) e desvio-padrão geométrico (σ_g), incluindo os métodos de cálculo correspondentes; indicar também o resultado de cada análise granulométrica efetuada.

Condições de realização dos ensaios

— elementos sobre a preparação do produto químico estudado, nomeadamente sobre eventuais métodos de redução da granulometria de sólidos ou de preparação de soluções do produto químico. Se o recurso a processos mecânicos for passível de ter alterado a composição do produto químico em estudo, incluir os resultados das análises efetuadas para verificar a composição deste,

— descrição (de preferência complementada por um esquema) do equipamento utilizado para gerar a atmosfera ensaiada e para expor os animais a essa atmosfera,

— elementos sobre o método de análise química utilizado e sobre a validação desse método (incluindo o rendimento da recuperação do produto químico em estudo do meio amostrado),

— fundamentação da escolha das concentrações utilizadas nos ensaios.

Resultados

— quadro com a temperatura, a humidade e o caudal de ar nas câmaras,

— quadro com as concentrações nominais e reais nas câmaras,

— quadro com os dados granulométricos, nomeadamente dados analíticos sobre a colheita de amostras, a distribuição granulométrica e os cálculos de MMAD e σ_g,

— quadro com os dados de resposta e as concentrações correspondentes a cada animal (animais que apresentaram sinais de toxicidade, incluindo mortalidade, com indicação da natureza, da intensidade, do momento do aparecimento e da duração dos efeitos),

— pesos corporais de cada animal registados durante o estudo; data e momento da morte, se anterior à eutanásia programada; aparecimento, evolução e eventual reversibilidade de sinais de toxicidade em cada animal,

— resultados da autópsia e resultados histopatológicos correspondentes a cada animal, se disponíveis,

— estimativas de letalidade (por exemplo, CL_{50} e DL_{01}), incluindo os intervalos de confiança a 95 % e o declive (se o método de avaliação o previr),

— relação estatística, incluindo uma estimativa do expoente "n" (protocolo C × t). Indicar também o nome do *software* estatístico utilizado.

▼M4

Discussão e interpretação dos resultados

— deve ser dada especial atenção à descrição dos métodos utilizados para satisfazer os critérios deste método de ensaio, nomeadamente no que respeita à concentração-limite e à granulometria,

— examinar em que medida, com base nos resultados globais, as partículas são respiráveis, em especial se os critérios granulométricos não forem satisfeitos,

— explicar por que razão terá sido necessário eutanasiar animais que apresentavam sinais de dor ou de grande sofrimento continuado, com base nos critérios do documento de orientações n.º 19 da OCDE, relativo aos parâmetros eticamente mensuráveis (8),

— explicar por que razão foram interrompidos ensaios segundo o capítulo B.52 (4) deste anexo para realizar ensaios segundo o método B.2, se assim tiver sucedido,

— a apreciação global do estudo deve incidir igualmente na coerência dos métodos utilizados para determinar as concentrações nominal e real e deve dar conta da relação entre estas concentrações,

— referir a causa provável da morte e o modo de ação predominante (sistémico ou local).

REFERÊNCIAS:

(1) OCDE (2009). Acute Inhalation Toxicity Testing. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 403. OCDE, Paris. Disponível em http://www.oecd.org/env/testguidelines.

(2) OCDE (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39. OCDE, Paris. Disponível em http://www.oecd.org/env/testguidelines.

(3) Regulamento (CE) n.º 1272/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16 de dezembro de 2008, relativo à classificação, rotulagem e embalagem de substâncias e misturas, que altera e revoga as Diretivas 67/548/CEE e 1999/45/CE, e altera o Regulamento (CE) n.º 1907/2006 (JO L 353 de 31.12.2008, p. 1).

(4) Capítulo B.52 deste anexo, "Toxicidade aguda por inalação — Método de classificação de toxicidade aguda".

(5) Capítulo B.40 deste anexo, "Corrosão da pele *in vitro*: Ensaio da resistência elétrica transcutânea (RET)".

(6) Capítulo B.40.A deste anexo, "Corrosão da pele *in vitro*: Ensaio em modelos de pele humana".

(7) OCDE (2005), In Vitro Membrane Barrier Test Method For Skin Corrosion. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 435. OCDE, Paris. Disponível em http://www.oecd.org/env/testguidelines.

(8) OCDE (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19. OCDE, Paris. Disponível em http://www.oecd.org/env/testguidelines.

(9) SOT (1992). Technical Committee of the Inhalation Specialty Section, Society of Toxicology (SOT). Recommendations for the Conduct of Acute Inhalation Limit Tests. *Fund. Appl. Toxicol.* 18:321-327.

(10) Phalen R.F. (2009). Inhalation Studies: Foundations and Techniques (2nd Edition). Informa Healthcare, New York.

▼**M4**

(11) Pauluhn J., Thiel A. (2007). A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. *J. Appl. Toxicol.* 27:160--167.

(12) Zwart J.H.E., Arts J.M., ten Berge W.F., Appelman L.M. (1992). Alternative Acute Inhalation Toxicity Testing by Determination of the Concentration-Time-Mortality Relationship: Experimental Comparison with Standard LC50 Testing. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 15:278-290.

(13) Zwart J.H.E., Arts J.M., Klokman-Houweling E.D., Schoen E.D. (1990). Determination of Concentration-Time-Mortality Relationships to Replace LC50 Values. *Inhal. Toxicol.* 2:105-117.

(14) Ten Berge W.F., Zwart A. (1989). More Efficient Use of Animals in Acute Inhalation Toxicity Testing. *J. Haz. Mat.* 21:65-71.

(15) OCDE (2009). Performance Assessment: Comparison of 403 and C × t Protocols via Simulation and for Selected Real Data Sets. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 104. OCDE, Paris. Disponível em http://www.oecd.org/env/testguidelines.

(16) Finney D.J. (1977). Probit Analysis, 3rd ed. Cambridge University Press, London/New York.

DEFINIÇÃO

Produto químico em estudo: Qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado este método de ensaio.

▼M4

Apêndice 1

Protocolo C × t

1. Na avaliação da toxicidade por inalação, um estudo sequencial de concentração em função do tempo (C × t) pode constituir alternativa ao protocolo tradicional utilizado (12)(13)(14). O protocolo C × t deve ser privilegiado quando a regulamentação aplicável ou critérios científicos exigem o ensaio em animais durante vários períodos, nomeadamente para efeitos de planeamento da resposta a situações de emergência e de ordenamento do território. Este procedimento começa, normalmente, pelo ensaio de uma concentração-limite (sessão de exposição I), expondo os animais ao produto químico em estudo durante cinco períodos diferentes (por exemplo, 15, 30, 60, 120 e 240 minutos), a fim de obter várias durações de exposição numa mesma sessão (ver a figura 1). Quando se trata do Regulamento (CE) n.º 1272/2008, as concentrações-limite aplicáveis são 20 000 ppm para gases, 20 mg/l para vapores e 5 mg/l para aerossóis. Estes níveis só podem ser excedidos se assim o exigirem a regulamentação aplicável ou razões científicas (ver o ponto 37 do texto principal do método B.2).

2. Nos casos em que se disponha de pouca ou nenhuma informação sobre a toxicidade do produto químico em estudo, deve efetuar-se um estudo preliminar no qual, geralmente durante 240 minutos, se expõem grupos de não mais de três animais de cada sexo às concentrações visadas escolhidas pelo diretor do estudo.

3. Se, na sessão de exposição I, se ensaiar uma concentração-limite e a mortalidade observada for inferior a 50 %, não são necessários mais ensaios. Se a regulamentação aplicável ou razões científicas exigirem que seja determinada a relação entre a concentração, o tempo de exposição e a resposta a esta última a níveis superiores à concentração-limite indicada, a exposição seguinte deve ser efetuada a uma concentração superior, por exemplo, dupla daquela (2L na figura 1).

4. Se for observada toxicidade à concentração-limite, são necessários ensaios complementares (estudo principal). Essas exposições adicionais são efetuadas a concentrações inferiores (sessões de exposição II, III ou IV' na figura 1) ou a concentrações superiores com tempos de exposição mais curtos (sessão de exposição IV na figura 1), adaptados e não tão espaçados.

5. Efetua-se o ensaio (concentrações inicial e seguintes) com um animal de cada sexo por ponto (C,t) ou com dois animais do sexo mais sensível por ponto (C,t). Em determinadas circunstâncias, fica ao critério do diretor do estudo utilizar dois ratos de cada sexo por ponto (C,t) – ou quatro animais do sexo mais sensível por ponto (C,t) (15). A utilização de dois animais de cada sexo por cada ponto (C,t) normalmente reduz os erros sistemáticos e a variabilidade das estimativas, aumenta a taxa de êxito destas últimas e melhora a cobertura do intervalo de confiança, comparativamente ao protocolo aqui descrito. Para mais informações, consultar o documento GD 39 (2).

6. O ideal é efetuar cada sessão de exposição no seu dia. Este procedimento permite adiar a exposição seguinte até existir um grau razoável de confiança na sobrevivência dos animais e possibilita que o diretor do estudo adapte a concentração visada e os tempos de exposição para a sessão seguinte. Recomenda-se começar cada sessão de exposição pelo grupo que será exposto durante mais tempo — no exemplo dado, pelo grupo de 240 minutos de exposição, seguindo-se o grupo de 120 minutos e assim por diante. Se, por exemplo, após 90 minutos, os animais do grupo de 240 minutos estiverem a morrer ou revelarem sinais de toxicidade intensos (por exemplo, alterações extremas da respiração, nomeadamente dificuldades respiratórias), não fará sentido expor um grupo durante 120 minutos, pois a mortalidade dos animais seria provavelmente de 100 %. Nessas circunstâncias, o diretor do estudo deverá selecionar tempos de exposição mais curtos para a concentração em causa (por exemplo, 90, 65, 45, 33 e 25 minutos).

▼M4

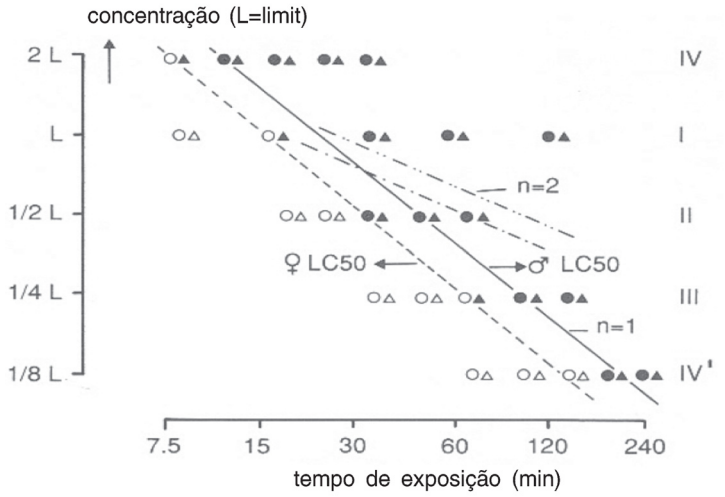
7. Deve medir-se com frequência a concentração na câmara, para determinar a concentração média no tempo para cada duração de exposição. Se possível, deve utilizar-se na análise estatística o momento da morte de cada animal, não a duração da exposição.

8. Uma vez efetuadas as quatro primeiras sessões de exposição, examinam-se os resultados obtidos para verificar se definem suficientemente uma curva da concentração em função do tempo (ver a figura 1). Se isso não acontecer, pode efetuar-se uma exposição suplementar (5.ª concentração). A concentração e os tempos de exposição utilizados na 5.ª exposição devem ser escolhidos de forma a obter os dados em falta.

9. Utilizam-se todas as sessões de exposição (incluída a primeira) para calcular a relação entre a concentração, o tempo de exposição e a resposta a esta última por análise estatística (16). Se possível, deve utilizar-se para cada ponto (C,t) a concentração média no tempo e o tempo de exposição até à morte (se ocorrer durante a exposição).

Figura 1

Exemplo hipotético de uma relação entre a concentração, o tempo de exposição e a mortalidade causada no rato



Símbolos só com contorno: animais sobreviventes; símbolos a cheio: animais mortos;

Triângulos: fêmeas; círculos: machos;

Linha a cheio: valores de CL_{50} (7,5 a 240 minutos) correspondentes a machos (n = 1);

Linha a tracejado: valores de CL_{50} (7,5 a 240 minutos) correspondentes a fêmeas (n = 1);

Linhas com tracejado e ponteado: linhas de valores hipotéticos de CL_{50} para machos e fêmeas com n = 2 (12).

Glossário

concentração;

tempo de exposição.

▼M4

10. Exemplo do procedimento sequencial:

Sessão de exposição I — Ensaio à concentração-limite (ver a figura 1)

— Um animal de cada sexo por ponto (C,t); 10 animais no total [a];

— Concentração visada [b] = concentração-limite;

— Exposição de cinco grupos de animais a esta concentração visada durante 15, 30, 60, 120 e 240 minutos, respetivamente.

↓

Sessão de exposição II [c] — Estudo principal

— Um animal de cada sexo por ponto (C,t); 10 animais no total;

— Exposição de cinco grupos de animais a uma concentração mais baixa [d] (1/2L), aumentando ligeiramente a duração das exposições (espaçamento de √2; ver a figura 1).

↓

Sessão de exposição III — Estudo principal

— Um animal de cada sexo por ponto (C,t); 10 animais no total;

— Exposição de cinco grupos de animais a uma concentração mais baixa [d] (1/4L), aumentando ligeiramente a duração das exposições (espaçamento de √2; ver a figura 1).

↓

Sessão de exposição IV — Estudo principal

— Um animal de cada sexo por ponto (C,t); 10 animais no total;

— Exposição de cinco grupos de animais a uma concentração mais baixa [d] (1/8 L), aumentando ligeiramente a duração das exposições (espaçamento de √2; ver a figura 1).

↓ ou

[a] Se não se dispuser de informações sobre a sensibilidade de cada sexo, utilizam-se ratos de ambos os sexos, isto é, um animal de cada sexo para cada concentração. Com base nas informações disponíveis, ou caso durante esta sessão de exposição se verifique que um dos sexos é mais sensível, utilizam-se 10 animais desse sexo – dois animais por ponto (C,t) – a cada concentração no resto do ensaio.

[b] Quando se trata do Regulamento (CE) n.º 1272/2008, as concentrações-limite aplicáveis são 20 000 ppm para gases, 20 mg/l para vapores e 5 mg/l para aerossóis. Caso se preveja toxicidade, ou se os resultados do estudo preliminar o aconselharem, devem escolher-se concentrações iniciais mais baixas. Se a regulamentação aplicável o exigir ou razões científicas o aconselharem, podem utilizar-se concentrações maiores.

[c] Idealmente, não se expõem animais ao nível de concentração seguinte enquanto não houver um grau razoável de confiança na sobrevivência dos últimos animais expostos. O diretor do estudo pode, então, ajustar a concentração visada e os tempos de exposição para a próxima sessão de exposição.

[d] A dose mínima (C × t) que produz mortalidade no ensaio à concentração inicial (primeira sessão de exposição) utiliza-se como orientação para estabelecer a próxima combinação de concentração e tempos de exposição. Normalmente, reduz-se a concentração a metade (1/2L) e Os animais são expostos durante períodos menos espaçados, distribuídos em série geométrica de fator 1,4 (√2; ver a referência 11) à volta do tempo correspondente à dose letal mínima (t × C) observada na primeira exposição. A figura 1 mostra que, na sessão de exposição I, se observou mortalidade pela primeira vez ao fim de 15 minutos, pelo que os tempos de exposição da sessão II, centrados nos 30 minutos, foram 15, 21 30, 42 e 60 minutos. Depois das duas primeiras exposições, é fortemente recomendado que se representem graficamente os dados conforme se fez na figura 1, verificando se a relação entre a concentração e o tempo define um ângulo de 45 graus (n = 1) ou se a relação entre a concentração, o tempo de exposição e a resposta a esta última tem um declive menor (por exemplo, n = 2) ou maior (por exemplo, n = 0,8). Nestes últimos casos, é fortemente recomendado que se adaptem em conformidade os tempos de exposição e concentrações seguintes.

▼M4

Sessão de exposição IV — Estudo principal

— Um animal de cada sexo por ponto (C,t); 10 animais no total;

— Exposição de cinco grupos de animais a uma concentração mais elevada ([e]) (2L), diminuindo ligeiramente a duração das exposições (espaçamento de √2; ver a figura 1).

Tratamento matemático dos resultados do protocolo C × t

11. O procedimento C × t gerará 20 ou 25 pontos, consoante se utilizem quatro ou cinco concentrações durante cinco períodos de exposição. Com base nesses pontos, pode calcular-se a relação C × t recorrendo à seguinte análise estatística (16):

Equação 1:

$$Probit(P) = b_0 + b_1 ln\ C + b_2 ln\ t$$

em que C é a concentração e t é o tempo de exposição; ou

Equação 2:

$$Resposta = f(C^n t)$$

em que $n = b_1/b_2$.

Recorrendo à equação 1, pode calcular-se o valor de CL_{50} correspondente a um determinado período (por exemplo, 4 h, 1 h, 30 minutos ou qualquer outro período da gama de tempos de exposição ensaiados) utilizando P = 5 (50 % de resposta). De notar que a regra de Haber só se aplica se n = 1. Pode calcular-se a CL_{01} utilizando P = 2,67.

([e]) Em determinados casos, pode ser necessário aumentar a concentração (2L) e associar-lhe novos tempos de exposição menos espaçados, distribuídos em série geométrica de fator 1,4 (√2) à volta do tempo correspondente à concentração letal mínima observada na primeira exposição. É preferível que a duração mínima da exposição seja superior a cinco minutos, não devendo a duração máxima exceder 8 horas.

▼B

B.3. **TOXICIDADE AGUDA (DÉRMICA)**

1. **MÉTODO**

1.1. INTRODUÇÃO

Ver Introdução Geral, parte B (ponto A).

1.2. DEFINIÇÃO

Ver Introdução Geral, parte B (ponto B).

1.3. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

Nenhumas.

1.4. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

Aplica-se a substância de ensaio sobre a pele de diversos grupos de animais de experiência, em doses graduadas, utilizando-se uma dose por grupo. Subsequentemente, procede-se à observação dos efeitos e das mortes ocorridas. Os animais que morrem durante o ensaio são submetidos a autópsia e no fim do ensaio os animais sobreviventes são também submetidos a autópsia.

Pode ser necessário sacrificar os animais que apresentem manifestações graves e permanentes de angústia e dor. Não se deve dosear as substâncias de ensaio de uma forma que se saiba provocar dor acentuada e angústia devido às suas propriedades corrosivas ou irritantes.

1.5. CRITÉRIOS DE QUALIDADE

Nenhum.

1.6. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.6.1. **Preparativos**

Os animais são mantidos nas suas gaiolas sob condições de alimentação e alojamento experimentais durante pelo menos cinco dias antes da experiência. Antes do ensaio os animais adultos jovens e saudáveis são seleccionados aleatoriamente e distribuídos por grupos de tratamento. Aproximadamente 24 horas antes do ensaio deve remover-se o pêlo da região dorsal dos animais, tosquiando-o ou rapando-o. Ao tosquiar ou ao rapar o pêlo é necessário tomar precauções para evitar lesões da pele que possam alterar a sua permeabilidade. A área destinada à aplicação da substância de ensaio não poderá ser inferior a 10 % da superfície corporal. Sempre que se procede ao ensaio de substâncias sólidas, as quais podem ser pulverizadas quando necessário, a substância de ensaio deve ser humedecida com água ou com um veículo apropriado para garantir um bom contacto com a pele. No caso de se utilizar um veículo, deve tomar-se em consideração a influência desse veículo relativamente à penetração da substância de ensaio na pele. Geralmente utilizam-se as substâncias de ensaio líquidas não diluídas.

1.6.2. **Condições de ensaio**

1.6.2.1. *Animais de experiência*

Pode ser utilizado o rato ou o coelho. Podem ser utilizadas outras espécies sendo necessário justificar a sua utilização. Devem utilizar-se as estirpes vulgarmente utilizadas em laboratório. Para cada sexo, no início do ensaio, o intervalo de variação do peso para os animais utilizados não deverá exceder ± 20 % do valor médio apropriado.

▼B

1.6.2.2. *Número e sexo*

Utilizam-se pelo menos cinco animais para cada dose. Devem ser todos do mesmo sexo. No caso de se utilizar fêmeas estas devem ser nulíparas e não devem estar grávidas. No caso de existir informação disponível demonstrando que um dos sexos é nitidamente mais sensível, deve fazer-se a administração das doses aos animais desse sexo.

Nota: Nos ensaios de toxicidade aguda com animais de uma ordem superior à dos roedores deve levar-se em consideração a possibilidade de utilizar um menor número de animais. As doses deverão ser seleccionadas cuidadosamente e deverão ser feitos todos os esforços possíveis para não exceder as doses moderadamente tóxicas. Nestes ensaios deve evitar-se a administração de doses letais da substância de ensaio.

1.6.2.3. *Doses*

Estas devem ser em número suficiente, pelo menos três, e adequadamente espaçadas para originarem grupos de ensaio com uma diversidade de efeitos tóxicos e de taxas de mortalidade. Ao tomar-se a decisão sobre as doses deve levar-se em consideração quaisquer efeitos irritantes ou corrosivos. Os dados deverão ser suficientes para permitirem traçar uma curva dose/resposta e, sempre que possível, uma determinação aceitável do valor DL_{50}.

1.6.2.4. *Teste limite*

Pode efectuar-se um teste limite com uma dose de pelo menos 2 000 mg/kg de peso do corpo num grupo de cinco machos e de cinco fêmeas utilizando os procedimentos anteriormente descritos. No caso de se observar mortalidade associada ao composto é necessário considerar a hipótese de realizar um estudo completo.

1.6.2.5. *Período de observação*

O período de observação deve ser de pelo menos 14 dias. Contudo o período de duração da observação não deve ser fixo rigidamente. Deve ser determinado pelas reacções tóxicas, o momento de aparecimento de sintomas e a duração do período de recuperação; em consequência, pode ser prolongado quando se considerar necessário. O momento em que as manifestações de toxicidade aparecem e desaparecem e o momento da morte são importantes, especialmente se existir uma tendência para retardar as mortes.

1.6.3. **Procedimento**

Os animais serão colocados em gaiolas individuais. A substância de ensaio será aplicada uniformemente numa área aproximadamente equivalente a 10 % da superfície total do corpo. No caso de substâncias altamente tóxicas, a superfície a utilizar poderá ser menor mas a camada da substância deverá ser o mais fina e uniforme possível.

A substância de ensaio deve ser mantida em contacto com a pele por meio de uma gaze porosa e de um adesivo antialérgico, durante um período de exposição de 24 horas. A superfície tratada será por sua vez convenientemente coberta de maneira a manter no seu lugar a gaze e a substância de ensaio e de modo a evitar que os animais ingiram a substância. Podem ser utilizados aparelhos de contenção para evitar a ingestão da substância mas não se recomenda a imobilização completa,

▼B

No fim do período de exposição é necessário eliminar todos os resíduos da substância, se possível, utilizando água ou qualquer outro meio adequado para limpeza da pele.

As observações devem ser feitas e registadas sistematicamente. São feitas fichas individuais para cada animal. As observações deverão ser efectuadas com frequência regular durante o primeiro dia. Deve efectuar-se um exame clínico cuidadoso pelo menos uma vez durante cada dia de trabalho, e deverão ser efectuadas outras observações diariamente tomando-se acções apropriadas para minimizar as perdas de animais submetidos a estudo, por exemplo, efectuar-se-á a autópsia ou a refrigeração dos animais encontrados mortos e efectuar-se-á o isolamento ou o sacrifício dos animais fracos ou moribundos.

As observações deverão incluir as modificações do pêlo, pele tratada, dos olhos e das mucosas, do aparelho respiratório, do aparelho circulatório, do sistema nervoso autónomo e central, bem como a actividade somatomotora e do comportamento. Deve prestar-se particular atenção à observação de tremores, convulsões, salivação, diarreia, letargia, sono e coma. O momento da morte deve ser registado com uma exactidão tão grande quanto possível. Os animais que morrem durante o ensaio e os que sobrevivem até ao fim do ensaio são submetidos a autópsia. Deverão ser registadas todas as modificações patológicas. Sempre que for aconselhável deverão ser preparadas amostras dos tecidos para exame histopatológico.

Avaliação da toxicidade no outro sexo

Depois de se ter completado o estudo relativamente a um dos sexos, submete-se a ensaio pelo menos um grupo de cinco animais do sexo oposto para se verificar se os animais desse sexo não são nitidamente mais sensíveis à substância de ensaio. Em circunstâncias individuais pode justificar-se a utilização de menos animais. No caso de existir informação adequada disponível suficiente para demonstrar que os animais do sexo testado são nitidamente mais sensíveis, é dispensável proceder a ensaios com animais do outro sexo.

2. **RESULTADOS**

Os resultados deverão ser resumidos em quadros indicando-se para cada grupo de experiência o número de animais no início do teste, o momento da morte de cada animal, o número de animais que exibem outras manifestações de toxicidade, a descrição dos efeitos tóxicos e os resultados da autópsia. Os pesos de cada animal deverão ser determinados e registados imediatamente antes da administração da substância de ensaio, decorrida uma semana e no momento da morte; as variações de peso deverão ser calculadas e registadas quando o período de sobrevivência exceder um dia. Procede-se ao registo dos animais que tiverem que ser sacrificados devido à dor e à angústia provocados pela substância procedendo-se de igual modo para as mortes provocadas pela substância. O valor DL_{50} pode ser determinado por um método reconhecido.

A avaliação dos resultados deverá incluir a relação, se existir, entre a exposição dos animais à substância de ensaio e a incidência e gravidade de todas as anormalidades, incluindo as anomalias de comportamento e clínicas, as lesões graves, as modificações do peso do corpo, a mortalidade e quaisquer outros efeitos toxicológicos.

3. **RELATÓRIO**

3.1. RELATÓRIO DO ENSAIO

O relatório do ensaio deverá conter, se possível, a informação seguinte:

▼B

— espécies, estirpe, origem, condições ambientais, dieta, etc.,

— condições experimentais (incluindo o método de limpeza da pele e tipo de gaze: oclusiva ou não oclusiva),

— níveis de dosagem (com veículo, no caso de este ser utilizado, e as concentrações),

— sexo dos animais submetidos à experiência,

— quadros com os dados de resposta por sexo e por valores de dosagem (isto é, número de animais que morreram ou que foram sacrificados durante os ensaios, número de animais que apresentam manifestações de toxicidade, número de animais expostos),

— momento da morte após a administração da dose, razões e critérios utilizados para o sacrifício dos animais,

— todas as observações,

— valor DL_{50} para o grupo do sexo submetido ao estudo completo ao longo do período de 14 dias (especificando-se o método de determinação),

— intervalo de confiança a 95 % para o valor DL_{50} (no caso de ser possível obter esse valor),

— curva dose/mortalidade e seu declive (no caso de isto ser possível com o método de determinação),

— resultados da autópsia,

— quaisquer resultados das observações histopatológicas,

— resultados de qualquer ensaio efectuado sobre o outro sexo,

— discussão dos resultados (deve prestar-se particular atenção ao efeito que o sacrifício dos animais durante o ensaio pode ter sobre o valor DL_{50} calculado),

— interpretação dos resultados.

3.2. AVALIAÇÃO E INTERPRETAÇÃO

Ver Introdução Geral, parte B (ponto D).

4. **REFERÊNCIAS**

Ver Introdução Geral, parte B (ponto E).

▼**M8**

B.4. **TOXICIDADE AGUDA: IRRITAÇÃO/CORROSÃO DÉRMICA**

INTRODUÇÃO

1. O presente método de ensaio é equivalente à *Test Guideline* 404 (2015) da OCDE. As diretrizes da OCDE para o ensaio de produtos químicos são revistas periodicamente, de modo a assegurar que refletem os melhores dados científicos disponíveis. Na revisão da *Test Guideline* 404 da OCDE, foi prestada particular atenção a possíveis melhorias no que respeita ao bem-estar dos animais e à avaliação de todas as informações existentes sobre o produto químico em estudo, a fim de evitar ensaios desnecessários em animais de laboratório. A versão atualizada da *Test Guideline* 404 da OCDE (originalmente adotada em 1981 e revista em 1992, 2002 e 2015) inclui uma referência ao documento de orientação sobre as abordagens integradas de ensaio e avaliação para irritação/corrosão dérmicas (1), propondo uma abordagem modular aplicável à irritação cutânea e à corrosão cutânea. A IATA descreve vários módulos que agrupam fontes de informação e ferramentas de análise; além disso: i) fornece orientações sobre como integrar e utilizar os ensaios existentes e os dados não provenientes de ensaios para a avaliação dos potenciais de irritação cutânea e de corrosão cutânea dos produtos químicos e ii) propõe uma abordagem quando há necessidade de ensaios complementares (1). Quando for apropriado, recomenda-se a aplicação sucessiva (não simultânea) dos três pensos de ensaio ao animal no ensaio *in vivo* inicial.

2. As definições de irritação e corrosão dérmica são estabelecidas no apêndice do presente método de ensaio.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

3. Tendo em conta o interesse científico e o bem-estar dos animais, não devem ser efetuados ensaios *in vivo* até se proceder a uma avaliação de todos os dados disponíveis relevantes para a potencial corrosibilidade/irritabilidade dérmica do produto químico numa análise de ponderação da suficiência da prova, conforme apresentado no Documento de Orientação sobre Abordagens Integradas de Ensaio e Avaliação da Corrosão e Irritação Dérmicas, ou seja, as três partes desta orientação e os módulos correspondentes (1). Sucintamente, na parte 1, os dados existentes são tratados em sete módulos que abrangem dados humanos, dados *in vivo*, dados *in vitro*, dados sobre as propriedades físico-químicas (por exemplo, pH, nomeadamente uma forte acidez ou alcalinidade) e métodos sem ensaios. Na parte 2, é efetuada a análise de ponderação da suficiência da prova. Se esta análise de ponderação da suficiência da prova ainda for inconclusiva, deve passar-se à parte 3, com ensaios adicionais, começando com métodos *in vitro*, sendo os ensaios *in vivo* o último recurso. Esta análise deve, pois, reduzir a necessidade de ensaios *in vivo* para a corrosão/irritação dérmica dos produtos químicos em estudo para os quais já existam dados suficientes provenientes de outros estudos em relação a estes dois fatores.

PRINCÍPIO DO ENSAIO IN VIVO

4. O produto químico em estudo é aplicado em dose única na pele de um animal de experiência; as áreas de pele não tratadas do animal de experiência são utilizadas como controlo. O grau de irritação/corrosão é observado e registado em intervalos determinados e detalhadamente descrito de modo a permitir uma avaliação completa dos efeitos. A duração do estudo deve ser suficiente para avaliar a reversibilidade ou irreversibilidade dos efeitos observados.

▼M8

5. Os animais que apresentem sinais de sofrimento e/ou dor intensos durante qualquer das etapas do ensaio devem ser abatidos e o produto químico em estudo deve ser classificado de acordo com estas observações. Os critérios para a decisão de abater animais moribundos e animais em grave sofrimento são objeto de um documento de orientação específico (2).

PREPARAÇÃO DO ENSAIO IN VIVO

Seleção de espécies animais

6. O coelho albino é o animal de laboratório mais adequado, devendo ser usados coelhos jovens adultos saudáveis. A utilização de outras espécies deve ser justificada.

Preparação dos animais

7. Aproximadamente 24 horas antes do ensaio, o pelo deve ser removido por corte curto na área dorsal do tronco dos animais. Deve ter-se o cuidado de não ferir a pele do animal e só devem ser usados animais com pele saudável e intacta.

8. Algumas estirpes de coelhos têm tufos densos de pelo, que são mais proeminentes em certas épocas do ano. Estas áreas de crescimento denso de pelo não devem ser utilizadas como local de ensaio.

Condições de alojamento e de alimentação

9. Os animais devem ser alojados individualmente. A temperatura do biotério para os coelhos deve ser de 20 °C (±3 °C). Embora a humidade relativa deva ser de pelo menos 30 % e de preferência não exceder os 70 %, exceto durante o período de limpezas, o valor pretendido deve ser de 50 %-60 %. A iluminação deve ser artificial, com uma alternância de 12 horas de luz e 12 horas de obscuridade. Na alimentação, podem ser utilizadas dietas convencionais de laboratório e deve ser fornecida água de beber sem restrições.

PROCEDIMENTO DE ENSAIO

Aplicação do produto químico em estudo

10. O produto químico em estudo deve ser aplicado numa pequena área de pele (aproximadamente 6 cm^2) e coberta com um penso de gaze, colado com fita adesiva não irritante. Nos casos em que não é possível aplicação direta (por exemplo, líquidos e algumas pastas), o produto químico em estudo deve ser aplicada num penso de gaze, que é, por sua vez, aplicado a pele. Durante o período de exposição, o penso deve estar em contacto com a pele de uma forma ligeiramente solta através de uma ligadura semioclusiva adequada. Se o produto químico em estudo for aplicado num penso, este deve ser mantido sobre a pele de modo a assegurar um bom contacto e uma distribuição uniforme da substância na pele. Deve ser evitado o acesso do animal ao penso e a ingestão ou inalação do produto químico em estudo.

11. Os produtos químicos em estudo líquidos são geralmente utilizados sem diluição. Quando se ensaiam sólidos (que podem ser pulverizados, caso tal seja considerado necessário), o produto químico em estudo deve ser humedecido com a menor quantidade de água (ou, se necessário, com outro excipiente adequado) suficiente para assegurar um bom contacto com a pele. No caso de serem utilizados excipientes que não água, a influência potencial do excipiente na irritação da pele pela substância de ensaio deve ser mínima ou nula.

12. No final do período de exposição, que é normalmente de quatro horas, o produto químico em estudo residual deve ser removido, caso tal seja praticável, utilizando água ou um solvente apropriado, que não altere a resposta ou a integridade da epiderme.

▼M8

Nível de dosagem

13. Aplica-se ao local de ensaio uma dose de 0,5 ml de líquido ou de 0,5 g de sólido ou pasta.

Ensaio inicial (ensaio *in vivo* de irritação/corrosão dérmica utilizando um animal)

14. No caso de um produto químico em estudo ter sido considerado corrosivo, irritante ou não classificado com base numa análise de ponderação da suficiência da prova ou em ensaios *in vitro* anteriores, não são, em princípio, necessários ensaios *in vivo* adicionais. No entanto, nos casos em que se considere necessária a obtenção de dados adicionais, o ensaio in vivo é realizado inicialmente utilizando a seguinte metodologia: aplicação sequencial de, no máximo, três pensos de ensaio ao animal. O primeiro penso é removido após três minutos. Caso não se observe qualquer reação grave na pele, aplica-se um segundo penso num local diferente, que é removido ao fim de uma hora. Se nesta etapa as observações indicarem que se pode aumentar o tempo de exposição para quatro horas em condições não agressivas para o animal, aplica-se um terceiro penso, que é removido após quatro horas, sendo a resposta devidamente graduada.

15. Caso seja observado um efeito corrosivo após qualquer das três exposições sequenciais, o ensaio é imediatamente finalizado. Caso não se observe qualquer efeito corrosivo após a remoção do último penso, o animal é observado durante 14 dias, exceto se se observar corrosão antes do final desse período.

16. Nos casos em que o produto químico em estudo não seja suscetível de provocar corrosão, mas possa ser irritante, deve ser aplicado um único penso a um animal durante quatro horas.

Ensaio de confirmação (ensaio *in vivo* de irritação dérmica com animais adicionais)

17. Se não for observado um efeito corrosivo no ensaio inicial, a resposta irritante ou negativa deve ser confirmada utilizando até dois animais adicionais, cada um com um penso e por um período de exposição de quatro horas. Se for observado um efeito irritante no ensaio inicial, o ensaio de confirmação pode ser efetuado de uma forma sequencial ou através da exposição simultânea de dois animais adicionais. No caso excecional de não ser efetuado um ensaio inicial, podem tratar-se dois ou três animais com um penso único, que é removido quatro horas após a aplicação. No caso serem utilizados dois animais e ambos apresentarem a mesma resposta, não é necessário efetuar mais ensaios. Caso contrário, o terceiro animal é igualmente sujeito a ensaio. Pode ser necessária a utilização de animais adicionais para confirmar respostas equívocas.

Período de observação

18. O período de observação deve ser suficiente para uma avaliação completa da reversibilidade dos efeitos observados. No entanto, a experiência deve ser interrompida em qualquer altura caso o animal apresente sinais continuados de dor ou sofrimento intensos. Para a determinação da reversibilidade dos efeitos, os animais devem ser observados durante 14 dias após a remoção dos pensos. No caso de se observar reversibilidade antes do final do período de 14 dias, deve interromper-se a experiência.

Observações clínicas e graduação das reações da pele

19. Todos os animais devem ser examinados para sinais de eritema e edema, sendo as respostas avaliadas 60 minutos e 24, 48 e 72 horas após a remoção do penso. No ensaio inicial com um animal, o local de ensaio é igualmente examinado imediatamente após a remoção do penso. As reações dérmicas são graduadas e registadas de acordo com a graduação da tabela *infra*. Caso ocorram danos na pele que não possam ser identificados como irritação ou corrosão após 72 horas, pode ser necessário efetuar observações até ao dia 14 para determinar a reversibilidade dos efeitos. Além da observação de irritação, todos os efeitos tóxicos locais, tais como perda de gordura cutânea e quaisquer efeitos sistémicos nocivos (por exemplo, efeitos em sintomas de

▼M8

toxicidade e efeitos no peso corporal), devem ser descritos e registados pormenorizadamente. Poderá ser efetuado um exame histopatológico para clarificar respostas equívocas.

20. A graduação das respostas dérmicas é necessariamente subjetiva. Para se promover a harmonização da graduação da resposta dérmica e auxiliar os laboratórios de ensaio e as pessoas envolvidas na obtenção e interpretação das observações, o pessoal que executa as observações deve receber formação adequada sobre o sistema de graduação utilizado (ver tabela *infra*). Poderá ser útil a consulta de um guia ilustrado para graduação da irritação dérmica e de outras lesões (3).

DADOS E RELATÓRIOS

21. Os resultados do estudo devem ser resumidos sob a forma de tabela no relatório final de ensaio e devem abranger todos os aspetos descritos no ponto 24.

Avaliação dos resultados

22. Os resultados de irritação dérmica devem ser avaliados conjuntamente com a natureza e a gravidade das lesões e a sua reversibilidade ou ausência de reversibilidade. As respostas individuais não representam um padrão absoluto das propriedades irritantes de um material, já que são também avaliados outros efeitos do material de ensaio. Pelo contrário, os resultados individuais devem ser encarados como valores de referência, que necessitam de ser avaliados conjuntamente com todas as outras observações efetuadas durante o estudo.

23. Deve-se ter em conta a reversibilidade das lesões dérmicas na avaliação da resposta irritante. Nos casos em que ocorram respostas como alopecia (área limitada), hiperqueratose, hiperplasia e descamação persistentes no final do período de 14 dias de observação, o produto químico em estudo deve ser considerada irritante.

Relatório de ensaio

24. O relatório do ensaio deve incluir as seguintes informações:

Fundamentação lógica do ensaio in vivo

— análise de ponderação da suficiência da prova relativa aos dados de ensaio preexistentes, incluindo os resultados da estratégia de ensaio sequencial;

— descrição dos dados relevantes disponíveis de ensaios anteriores;

— dados obtidos em cada etapa da estratégia de ensaio;

— descrição dos ensaios *in vitro* efetuados, incluindo informações sobre o protocolo, resultados obtidos com substâncias de ensaio/referência;

— análise de ponderação da suficiência da prova para a realização do estudo *in vivo*.

Produto químico em estudo

— substância monocomponente: dados de identificação química, como as denominações IUPAC ou CAS, número CAS, código SMILES ou InChI, fórmula estrutural, pureza, identidade química das impurezas, caso se justifique e seja exequível, etc.;

▼**M8**

— substância multicomponentes, mistura e substâncias de composição desconhecida ou variável, produtos de reação complexos ou materiais biológicos (UVCB): caracterização, tanto quanto possível, por identidade química (ver *supra*), ocorrência quantitativa e principais propriedades físico-químicas dos componentes;

— aspeto físico, solubilidade em água e ouras propriedades físico-químicas pertinentes;

— proveniência, número do lote, se disponíveis;

— tratamento do produto químico em estudo/substância de controlo antes do ensaio, se for o caso;

— estabilidade do produto químico em estudo, data-limite de utilização ou data de reanálise, se conhecidas;

— condições de armazenagem.

Veículo

— identificação, concentração (se pertinente), volume utilizado;

— justificação do excipiente escolhido.

Animais de ensaio

— espécie/estirpe utilizada, justificação da eventual utilização de outros animais que não coelhos albinos;

— número de animais de cada sexo;

— peso de cada animal no início e no final do ensaio;

— idade no início do estudo;

— origem dos animais, condições de alojamento, dieta, etc.

Condições de realização do ensaio

— pormenores relativos à preparação da zona de ensaio;

— pormenores relativos aos materiais e técnicas de apósito utilizadas;

— descrição pormenorizada da preparação, aplicação e remoção do produto químico em estudo.

Resultados

— tabelas com a classificação das respostas de irritação/corrosão para cada animal em cada observação;

— descrição de todas as lesões observadas;

— descrição pormenorizada da natureza e grau da irritação ou corrosão observada e de quaisquer observações histopatológicas;

— descrição de quaisquer outros efeitos nocivos locais (por exemplo, perda de gordura cutânea) e efeitos sistémicos, além da irritação ou corrosão dérmica.

▼**M8**

Discussão dos resultados

Conclusões

BIBLIOGRAFIA

(1) OCDE (2014). Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (N.º 203), Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Económicos, Paris.

(2) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998.

(3) OCDE (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 19), Organistion for Economic Cooperation and Development, Paris.

▼**M8**

Quadro

Graduação de Reações dérmicas

Formação de eritema e escara

Ausência de eritema	0
Eritema muito ligeiro (fracamente discernível)	1
Eritema bem definido	2
Eritema moderado a grave	3
Eritema grave (vermelhidão cor de carne) e formação de escara que impede a graduação do eritema	4

Máximo possível: 4

Formação de edema

Número de edemas	0
Edema muito ligeiro (fracamente discernível)	1
Edema ligeiro (bordos da área bem definida por elevação delineada)	2
Edema moderado (com uma elevação de aproximadamente 1 mm	3
Edema grave (com uma elevação superior a 1 mm e excedendo a área de exposição)	4

Máximo possível: 4

Poderá ser efetuado um exame histopatológico para clarificar respostas equívocas.

▼**M8**

Apêndice

DEFINIÇÕES

Produto químico: uma substância ou mistura.

Irritação dérmica: consiste na produção de danos reversíveis na pele após a aplicação do produto químico em estudo, por um período não superior a quatro horas.

Corrosão dérmica: consiste na produção de danos irreversíveis na pele, nomeadamente necrose visível através da epiderme e que atinge a derme, após a aplicação do produto químico em estudo por um período não superior a quatro horas. São exemplos típicos de reações corrosivas as úlceras, hemorragias e escaras sanguinolentas e, perto do final do período de observação de 14 dias, a descoloração, devido à perda de pigmentação da pele, a formação de zonas de alopecia total e a ocorrência de cicatrizes. As lesões duvidosas poderão ser esclarecidas por métodos histopatológicos.

Produto químico em estudo: qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado o presente método de ensaio.

▼M7

B.5. **IRRITAÇÃO/CORROSÃO OCULAR AGUDAS**

INTRODUÇÃO

Este método de ensaio é equivalente ao *Test Guideline* 405 (2012) da OCDE. Para que espelhem o estado da ciência, os *Test Guidelines* da OCDE para o ensaio de produtos químicos são revistos periodicamente. Em revisões anteriores do *Test Guideline* 405, foi dada especial atenção aos possíveis melhoramentos resultantes da avaliação de toda a informação já existente sobre o produto químico em estudo, de modo a evitar ensaios desnecessários em animais de laboratório e assim atender à problemática do bem-estar animal. O *Test Guideline* 405 (adotado em 1981 e atualizado em 1987, 2002 e 2012) inclui a recomendação de se efetuar uma análise de ponderação da suficiência da prova (1) dos dados relevantes já existentes antes de se realizar o ensaio *in vivo* descrito para a irritação/corrosão aguda. No caso de não se encontrarem disponíveis dados suficientes, recomenda-se a obtenção desses dados através da aplicação de ensaios sequenciais (2) (3). A estratégia de ensaio recomendada inclui a realização de ensaios *in vitro* validados e reconhecidos, como se descreve no suplemento do presente método. As orientações da Agência Europeia dos Produtos Químicos (ECHA) compreendem igualmente uma estratégia de ensaio integrada (21) para os efeitos do Regulamento (CE) n.º 1907/2006, relativo ao registo, avaliação, autorização e restrição dos produtos químicos (REACH) ([1]). Apenas se deve recorrer a ensaios em animais se tal vier a ser considerado necessário depois de examinados os métodos alternativos disponíveis e de aplicados os tidos como adequados. À data da atualização do presente método de ensaio, há casos em que continua a ser necessário recorrer a este método ou em que determinados quadros legislativos o exigem.

A atualização mais recente, sem incidências nos conceitos básicos e na estrutura das orientações de ensaio, centrou-se na utilização de analgésicos e de anestésicos. O ICCVAM ([2]) e um painel científico internacional independente de pares avaliadores examinaram a utilidade e as limitações da utilização rotineira de anestésicos tópicos, de analgésicos sistémicos e de parâmetros eticamente aceitáveis em ensaios de irritação ocular *in vivo* realizados por razões de segurança. Concluiu-se do exame efetuado que o recurso a anestésicos tópicos e a analgésicos sistémicos pode eliminar praticamente ou mesmo eliminar na totalidade a dor e o sofrimento causados aos animais, sem prejudicar os resultados dos ensaios, tendo sido recomendada a utilização sistemática dessas substâncias. O presente método tem em conta o referido exame. Nos ensaios de irritação e corrosão ocular aguda *in vivo* devem ser utilizados rotineiramente anestésicos tópicos, analgésicos sistémicos e parâmetros eticamente aceitáveis. As exceções a este princípio têm de ser justificadas. Os aperfeiçoamentos incorporados no presente método reduzirão substancialmente ou eliminarão mesmo a dor e o sofrimento dos animais na maior parte das situações ensaiadas, nos casos em que continue a ser necessário realizar ensaios oculares *in vivo* por razões de segurança.

Uma gestão preventiva e equilibrada da dor passa: (i) pela administração rotineira de um anestésico tópico (proparacaína ou tetracaína, por exemplo) e de um analgésico sistémico (por exemplo a buprenorfina) antes da aplicação do produto químico em estudo; (ii) por um programa de analgesia sistémica de rotina após a aplicação do produto químico em estudo (através da buprenorfina e do meloxicam, por exemplo); (iii) por um programa de observação, monitorização e registo de sinais clínicos de dor e/ou sofrimento nos animais; (iv) por um programa de observação, monitorização e registo da natureza, intensidade e evolução das lesões oculares. Apresentam-se mais elementos nos procedimentos atualizados

([1]) Regulamento (CE) n.º 1907/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 18 de dezembro de 2006, relativo ao registo, avaliação, autorização e restrição dos produtos químicos (REACH), que cria a Agência Europeia dos Produtos Químicos, que altera a Diretiva 1999/45/CE e revoga o Regulamento (CEE) n.º 793/93 do Conselho e o Regulamento (CE) n.º 1488/94 da Comissão, bem como a Diretiva 76/769/CEE do Conselho e as Diretivas 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE e 2000/21/CE da Comissão (JO L 304 de 22.11.2007, p. 1).

([2]) *Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods* (comité de coordenação interagências na validação de métodos alternativos, dos E.U.A.).

▼M7

a seguir descritos. Para evitar interferências no estudo, não devem ser administrados anestésicos ou analgésicos tópicos depois de administrado o produto químico em estudo. Os analgésicos anti-inflamatórios (por exemplo o meloxicam) não devem ser aplicados por via tópica e as doses utilizadas por via sistémica não devem interferir nos efeitos oculares.

Estabelecem-se definições no apêndice 1 do método de ensaio.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Tendo em vista o melhor interesse científico e o bem-estar animal, não se deve encarar a realização de ensaios *in vivo* enquanto não tiverem sido avaliados, por meio de uma análise de ponderação da suficiência da prova, todos os dados disponíveis relevantes para os potenciais efeitos corrosivos/irritantes do produto químico ao nível ocular. Os dados compreendem elementos indiciadores de estudos já realizados no ser humano e/ou em animais de laboratório, provas de efeitos corrosivos/irritantes de uma ou mais substâncias estruturalmente afins ou de misturas dessas substâncias, dados reveladores de elevada acidez ou alcalinidade do produto químico (4) (5) e resultados de ensaios *in vitro* ou *ex vivo* de corrosão da pele e de corrosão/irritação ocular validados e reconhecidos (6) (13) (14) (15) (16) (17). Estes estudos podem ter sido realizados antes de uma análise de ponderação da suficiência da prova ou tê-lo sido no seguimento dessa análise.

No caso de alguns produtos químicos, a referida análise pode revelar a necessidade de estudos *in vivo* do potencial de irritação/corrosão ocular do produto químico. Nesses casos, antes de se ponderar a realização de um ensaio ocular *in vivo*, deve efetuar-se, preferencialmente, um estudo *in vitro* e/ou *in vivo* dos efeitos de corrosão da pele do produto químico, a avaliar de acordo com a estratégia de ensaio sequencial descrita no método de ensaio B.4 (7) ou com a estratégia de ensaio integrada descrita nas orientações da Agência Europeia dos Produtos Químicos (21).

O presente método compreende um suplemento descritivo de uma estratégia de ensaio sequencial que contempla a realização de ensaios validados de corrosão/ /irritação ocular *in vitro* ou *ex vivo*. A mesma estratégia é contemplada nas orientações da ECHA, para efeitos do Regulamento REACH (21). Recomenda-se a aplicação dessa estratégia de ensaio sequencial antes da realização de ensaios *in vivo*. No caso dos produtos químicos novos, recomenda-se o recurso a uma metodologia de ensaio por etapas para obter dados científicos fiáveis sobre os efeitos corrosivos/irritantes do produto químico. No caso dos produtos químicos já existentes, mas para os quais não se disponha de dados suficientes sobre corrosão/irritação da pele e corrosão/irritação ocular, pode recorrer-se à referida estratégia para obter os dados em falta. Caso se opte por uma estratégia ou um protocolo de ensaio diferente ou se decida não aplicar uma metodologia de ensaio por etapas, será necessário justificá-lo.

PRINCÍPIO DO ENSAIO *IN VIVO*

Após a administração de um analgésico sistémico e a indução da anestesia tópica adequada, aplica-se uma dose única do produto químico em estudo num dos olhos do animal utilizado no ensaio, servindo o outro olho de amostra de controlo. Avalia-se o grau de irritação/corrosão ocular pontuando as lesões da conjuntiva, da córnea e da íris a intervalos determinados. Para possibilitar uma avaliação completa dos efeitos, também se descrevem os outros efeitos oculares e as perturbações sistémicas. A duração do estudo deve ser suficiente para avaliar a reversibilidade ou irreversibilidade dos efeitos.

Os animais que, em qualquer estádio do ensaio, apresentem sinais de dor e/ou sofrimento acentuados ou lesões que excedam os níveis máximos eticamente aceitáveis descritos neste método (ver o ponto 26) devem ser eutanasiados, procedendo-se à avaliação do produto químico em conformidade. Os critérios por que se deve reger a decisão de eutanasiar animais moribundos e animais em grande sofrimento constam de um documento de orientações da OCDE (8).

▼M7

PREPARAÇÃO PARA O ENSAIO *IN VIVO*

Escolha da espécie

O coelho albino é o animal de laboratório mais adequado, devendo recorrer-se a animais adultos jovens e saudáveis. Se forem utilizadas outras estirpes ou espécies será necessário justificá-lo.

Preparação dos animais

24 horas antes de lhe dar início, examinam-se ambos os olhos de cada animal provisoriamente selecionado para o ensaio. Não devem ser utilizados animais que apresentem irritação ocular, defeitos oculares ou lesões da córnea.

Condições de alojamento e de alimentação

Os animais devem ser alojados individualmente. A temperatura do biotério para o coelho deve ser de 20 °C (± 3 °C). A humidade relativa deve estar compreendida entre 50 % e 60 %, embora sejam aceitáveis valores compreendidos entre 30 %, no mínimo, e um valor máximo que, preferencialmente, não deve exceder 70 %, salvo durante os períodos de limpeza do biotério. A iluminação deve ser artificial, com uma alternância de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão. A intensidade luminosa não deve ser excessiva. Para a alimentação, podem ser usadas dietas convencionais de laboratório, com acesso ilimitado a água potável.

PROTOCOLO DE ENSAIO

Utilização de anestésicos tópicos e de analgésicos sistémicos

Para evitar ou minimizar a dor e o sofrimento nos ensaios oculares realizados por razões de segurança, recomendam-se os procedimentos a seguir descritos. Em alternativa, pode proceder-se de outro modo que comprovadamente permita evitar ou aliviar a dor e o sofrimento com eficácia idêntica ou superior à destes procedimentos.

— Para gerar um nível terapêutico de analgesia sistémica, administram-se, por injeção subcutânea, 0,01 mg de buprenorfina por quilograma, sessenta minutos antes da aplicação do produto químico em estudo. Não há indicações disso nem é previsível que a administração sistémica de buprenorfina e outros analgésicos opiáceos similares influencie as reações oculares (12).

— Cinco minutos antes da aplicação do produto químico em estudo, aplicam-se a cada olho uma ou duas gotas de um anestésico tópico ocular (por exemplo cloridrato de proparacaína a 0,5 % ou cloridrato de tetracaína a 0,5 %). Para evitar eventuais interferências no estudo, recomendam-se anestésicos tópicos sem conservantes. Serve de amostra de controlo o olho de cada animal que não recebe o produto químico em estudo, mas que é anestesiado por via tópica. Se for previsível que cause dor e sofrimento acentuados, o produto químico em estudo não será normalmente ensaiado *in vivo*. Todavia, em caso de dúvida ou se for necessário realizar o ensaio, deve ponderar-se a realização de aplicações adicionais do anestésico tópico a intervalos de cinco minutos, antes da aplicação do produto químico em estudo. Alerta-se, porém, para o facto de que aplicações múltiplas de anestésicos tópicos podem aumentar ligeiramente a gravidade das lesões induzidas pela aplicação do produto químico em estudo e/ou o tempo de reversão das mesmas.

— Para gerar um nível terapêutico contínuo de analgesia sistémica, injetam-se por via subcutânea 0,01 mg de buprenorfina por quilograma e 0,5 mg de meloxicam por quilograma, oito horas após a aplicação do produto químico em estudo. Embora os dados disponíveis não apontem para nenhum efeito anti-inflamatório do meloxicam nos olhos quando administrado diariamente por via subcutânea, este analgésico não deve ser administrado antes de transcorridas 8 horas sobre a aplicação do produto químico, para evitar qualquer interferência com o estudo (12).

— Após a primeira injeção 8 horas depois de aplicado o produto químico em estudo, injetam-se por via subcutânea 0,01 mg de buprenorfina por quilograma, de doze em doze horas, em associação com 0,5 mg de meloxicam por quilograma, de 24 em 24 horas, até ao desaparecimento das lesões oculares e

▼M7

de qualquer sinal clínico de dor ou sofrimento. Para diminuir a frequência da administração de analgésicos, pode ponderar-se o recurso a preparações analgésicas de libertação prolongada.

— Se a analgesia preventiva e a anestesia tópica se revelarem inadequadas, deve proceder-se a uma analgesia de emergência imediatamente após a aplicação do produto químico em estudo. Se um animal evidenciar sinais de dor ou sofrimento durante o estudo, em vez da aplicação subcutânea de 0,01 mg de buprenorfina por quilograma de doze em doze horas, deve ser-lhe imediatamente ministrada, por via subcutânea, uma dose de emergência de 0,03 mg de buprenorfina por quilograma, a qual, se necessário, pode ser repetida, com intervalos não inferiores a 8 horas. Em associação com a dose de emergência de buprenorfina, mas só depois de transcorridas 8 horas sobre a aplicação do produto químico em estudo, administram-se, por via subcutânea, 0,5 mg de meloxicam por quilograma, de 24 em 24 horas.

Aplicação do produto químico em estudo

Deposita-se o produto químico em estudo no saco conjuntival de um dos olhos de cada animal, depois de cuidadosamente afastada do globo ocular a pálpebra inferior. Em seguida, juntam-se cuidadosamente as pálpebras durante cerca de um segundo, para evitar perdas. O outro olho, no qual não é aplicado o produto químico em estudo, serve de amostra de controlo.

Irrigação

Os olhos dos animais utilizados no ensaio não devem ser lavados durante, pelo menos, as 24 horas seguintes à instilação do produto químico em estudo, exceto no caso dos sólidos (ver o ponto 18) e se surgir imediatamente alguma manifestação de corrosão ou de irritação. Passadas 24 horas, pode efetuar-se uma lavagem, se se considerar adequado.

Não se recomenda a utilização de um grupo-satélite de animais para investigar a influência da lavagem, a menos que razões científicas o justifiquem. Se for necessário um grupo-satélite de animais, este deve ser constituído por dois coelhos. As condições de lavagem devem ser cuidadosamente documentadas; por exemplo: data e hora da lavagem; composição e temperatura da solução de lavagem; duração, volume e velocidade de aplicação.

Nível de dosagem

1) *Ensaio de líquidos*

No ensaio de líquidos utiliza-se uma dose de 0,1 ml. Não devem ser utilizados nebulizadores de bomba para instilar diretamente o produto químico no olho. O líquido deve ser nebulizado e recolhido num recipiente antes de se instilarem 0,1 ml no olho.

2) *Ensaio de sólidos*

No ensaio de sólidos, massas ou produtos químicos em partículas, a quantidade a utilizar deve ser de 0,1 ml ou uma massa não superior a 100 mg. O produto químico em estudo deve ser reduzido a um pó fino. O volume da matéria sólida deve ser medido após compactação ligeira; por exemplo: batendo várias vezes, com cuidado, no recipiente que a contém. Se, aquando da primeira observação, 1 hora após a aplicação do produto químico sólido em estudo, este não tiver sido removido, pelos mecanismos fisiológicos, do olho do animal ensaiado, pode lavar-se o olho com soro fisiológico ou água destilada.

3) *Ensaio de aerossóis*

Recomenda-se que o volume a instilar seja previamente extraído do nebulizador de bomba ou pulverizador de aerossol, antes de o aplicar no olho. A única exceção é para produtos químicos que se apresentem em recipientes de aerossol pressurizados, os quais não podem ser previamente extraídos por se vaporizarem. Nesses casos, deve manter-se o olho aberto e administrar-se o produto químico por meio de um jato único com a duração aproximada de um segundo, mantendo o recipiente à distância de 10 cm, diretamente à frente do olho. A distância pode variar em função da pressão do jato e da composição do mesmo. Devem ser tomadas precauções adequadas para que a pressão do jato não lesione o olho. Em determinados casos, pode ser necessário avaliar o potencial de lesão «mecânica» do olho pela força exercida pelo jato.

▼M7

Pode obter-se uma estimativa da dose de um aerossol através da simulação da aplicação no ensaio da seguinte forma: pulveriza-se o produto químico para um papel de pesagem através de uma abertura do tamanho de um olho de coelho, colocada diretamente à frente do papel. O aumento de peso do papel corresponde aproximadamente à quantidade pulverizada no olho. No caso dos produtos químicos voláteis, pode estimar-se a dose pesando o recipiente que contém o produto químico em estudo antes e depois de este dele ser retirado.

Ensaio inicial (ensaio *in vivo* de irritação/corrosão ocular num único animal)

Recomenda-se vivamente que o ensaio *in vivo* seja realizado uma primeira vez num único animal (ver o suplemento «Estratégia de ensaio sequencial para irritação e corrosão oculares» a este método de ensaio). A passagem ou não a um ensaio de confirmação noutro animal depende da intensidade e do grau de reversibilidade observados no primeiro.

Se os resultados deste primeiro ensaio, realizado conforme descrito, indicarem que o produto químico é corrosivo ou irritante severo para o olho, deve pôr-se termo aos ensaios de irritação ocular.

Ensaio de confirmação (ensaio *in vivo* de irritação ocular noutros animais)

Se, no ensaio inicial, não for observada corrosão nem irritação severa, é necessário confirmar a reação de irritação ou a reação negativa noutro animal ou noutros dois animais. Se, no ensaio inicial, for observada irritação, recomenda-se que o ensaio de confirmação seja realizado num animal de cada vez, não expondo os dois animais simultaneamente. Se for observada corrosão ou irritação severa no segundo animal, não se continua o ensaio. Se os resultados observados no segundo animal permitirem estabelecer uma classificação de perigosidade, também não será necessário prosseguir o ensaio.

Período de observação

O período de observação deve ser suficiente para uma avaliação completa da intensidade e da reversibilidade dos efeitos observados. No entanto, as experiências devem ser imediatamente interrompidas se algum animal apresentar sinais de dor intensa ou de grande sofrimento (8). Para determinar a reversibilidade dos efeitos, normalmente os animais devem ser examinados durante 21 dias após a administração do produto químico em estudo. Caso se observe reversibilidade antes de terminado o período de 21 dias, interrompem-se imediatamente as experiências.

Exames clínicos e pontuação das reações oculares

Uma hora após a aplicação do produto químico em estudo e, subsequentemente, pelo menos uma vez por dia, observam-se atentamente os olhos para verificar a presença ou ausência de lesões oculares. Nos três primeiros dias, os animais devem ser examinados várias vezes por dia, para que as eventuais decisões de pôr termo aos ensaios possam ser tomadas atempadamente. Os animais utilizados no ensaio devem ser sujeitos a exames de rotina durante o estudo, pelo menos duas vezes por dia, respeitando um intervalo de, pelo menos, seis horas entre os exames (que, ainda assim, pode ser reduzido em caso de necessidade), com vista à deteção de sinais clínicos de dor e/ou sofrimento (por exemplo, tocam repetidamente com as patas no olho, ou coçam-no repetidamente, pestanejam demasiado ou lacrimejam muito) (9) (10) (11). Estes exames são necessários para: (i) detetar adequadamente qualquer sinal de dor ou de sofrimento dos animais, a fim de poder tomar decisões fundamentadas sobre a necessidade de aumentar ou não a dose de analgésicos; (ii) detetar qualquer indício de que os níveis máximos eticamente aceitáveis tenham sido excedidos, a fim de poder tomar decisões fundamentadas sobre a conveniência de eutanasiar os animais, em ambos os casos atempadamente. Para facilitar a deteção e a medição das lesões oculares e determinar se os níveis máximos eticamente aceitáveis já foram excedidos, utiliza-se normalmente a coloração pela fluoresceína e, se necessário (por exemplo para determinar a profundidade da lesão em caso de ulceração da córnea), um

▼M7

biomicroscópio equipado com lâmpada de fenda. Para referência e para manter um registo permanente da extensão das lesões oculares, podem tirar-se fotografias digitais das lesões observadas. Os animais só devem ser mantidos em ensaio durante o tempo necessário para obter informações definitivas. Os que evidenciem dor intensa ou grande sofrimento devem ser eutanasiados sem demora, procedendo-se à avaliação do produto químico em conformidade.

Devem ser eutanasiados os animais que, depois da instilação, apresentem as seguintes lesões oculares (ver no quadro 1 a descrição da graduação das lesões): perfuração da córnea ou ulceração significativa da córnea associada a estafiloma; presença de sangue na câmara anterior do olho; opacidade da córnea de grau 4; ausência de reflexo à luz (resposta da íris de grau 2), persistente durante 72 horas; ulceração da membrana conjuntival; necrose das conjuntivas ou da membrana nictitante; ou descamação. A razão disto é que normalmente estas lesões são irreversíveis. Recomenda-se ainda que as lesões oculares a seguir indicadas sejam consideradas motivo eticamente suficiente para pôr termo ao estudo antes de concluído o período de observação programado de 21 dias (trata-se de lesões indiciadoras de sintomatologia de efeitos corrosivos ou de irritação severa e de lesões previsivelmente não reversíveis na totalidade até ao final do período de observação de 21 dias): lesões muito profundas (por exemplo ulcerações da córnea que vão além das camadas superficiais do estroma), destruição do limbo superior a 50 % (evidenciada pelo embranquecimento do tecido conjuntival) e infeção ocular severa (corrimento purulento). A associação de vascularização da superfície da córnea (pano) a uma superfície corada pela fluoresceína que não vai diminuindo dia a dia e/ou à inexistência de reepitelização 5 dias após a aplicação do produto químico em estudo também pode ser ponderada como critério potencialmente útil a ter em conta nas decisões clínicas de pôr ou não termo ao estudo antecipadamente. Todavia, cada uma destas observações não é, por si só, suficiente para justificar o termo antecipado do estudo. Se forem detetados efeitos oculares severos, deve solicitar-se, ao veterinário assistente, a outro veterinário especializado em animais de laboratório ou a pessoal formado na identificação de lesões clínicas, que proceda a um exame clínico para determinar se a associação dos ditos efeitos constitui motivo suficiente para antecipar o termo do estudo. Determinam-se e registam-se os graus de reação ocular (das conjuntivas, da córnea e da íris) transcorridas 1, 24, 48 e 72 horas sobre a aplicação do produto químico em estudo (quadro 1). Os animais nos quais não se desenvolvam lesões oculares nos três dias subsequentes à instilação podem ser retirados do estudo. Os que não apresentem lesões severas devem permanecer sob observação até ao desaparecimento das lesões ou durante 21 dias, após o que se põe termo ao estudo. Como mínimo, os exames de avaliação de lesões e de apreciação da reversibilidade ou irreversibilidade destas devem ser efetuados, e os seus resultados registados, transcorridos 1 hora, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 7 dias, 14 dias e 21 dias sobre a aplicação do produto químico em estudo. Se necessário, podem realizar-se exames mais frequentes para determinar se um determinado animal deve ser eutanasiado, com base em critérios éticos, ou retirado do estudo, por evidenciar resultados negativos.

Ao realizar um exame, registam-se os graus das lesões oculares (quadro 1). Quaisquer outras lesões oculares (por exemplo: pano da córnea, coloração ou alterações da câmara anterior) ou perturbações sistémicas devem igualmente ser mencionadas no relatório.

O exame das reações pode ser facilitado pela utilização de uma lupa binocular, de uma lâmpada de fenda portátil, de um biomicroscópio ou de outro instrumento apropriado. Uma vez registadas as observações às 24 horas, pode prosseguir-se o exame dos olhos com o auxílio de fluoresceína.

A graduação das reações oculares é necessariamente subjetiva. Numa perspetiva de harmonização da graduação das reações oculares e em benefício dos laboratórios de ensaio e das pessoas envolvidas na realização dos exames e na interpretação das observações, o pessoal que realiza os exames deve receber formação adequada sobre o sistema de graduação utilizado.

▼M7

DADOS E RELATÓRIOS

Avaliação dos resultados

Os graus de irritação ocular devem ser avaliados conjuntamente com a natureza, a intensidade e a reversibilidade ou irreversibilidade das lesões. As pontuações individuais não representam um padrão absoluto das propriedades irritantes do produto químico em estudo, pois são também avaliados outros efeitos do mesmo. Pelo contrário, as pontuações individuais devem ser encaradas como valores de referência e só têm significado quando enquadradas numa descrição e numa avaliação completas do conjunto das observações.

Relatório do ensaio

Elementos a constar do relatório do ensaio:

Justificação do ensaio in vivo: análise de ponderação da suficiência da prova dos dados de ensaios anteriores, incluindo os resultados da estratégia de ensaio sequencial:

— descrição dos dados relevantes disponíveis provenientes de ensaios anteriores;

— dados obtidos em cada etapa da estratégia de ensaio;

— descrição dos ensaios *in vitro* realizados, incluindo detalhes sobre o protocolo seguido e os resultados obtidos com os produtos químicos em estudo/de referência;

— descrição do estudo *in vivo* de irritação/corrosão dérmica realizado, incluindo os resultados obtidos;

— modo como a análise de ponderação da suficiência da prova redundou na realização do estudo *in vivo*.

Produto químico em estudo:

— dados de identificação (por exemplo: denominação química e, se conhecido, número CAS, grau de pureza, impurezas conhecidas, proveniência, número de lote);

— natureza física e propriedades físico-químicas (por exemplo: pH, volatilidade, solubilidade, estabilidade, reatividade com água);

— no caso das misturas, identificação dos componentes, incluindo os dados identificativos das substâncias componentes (por exemplo: denominações químicas e, se conhecidos, os números CAS) e as respetivas concentrações;

— dose aplicada.

Excipiente:

— identificação, concentração (se pertinente), volume utilizado;

— justificação do excipiente escolhido.

Animais ensaiados:

— espécie/estirpe utilizada, justificação da eventual utilização de outros animais que não coelhos albinos;

— idade de cada animal no início do estudo;

— número de animais de cada sexo no grupo de ensaio e nos grupos de controlo necessários;

— peso de cada animal no início e no final do ensaio;

— origem, condições de alojamento, dieta etc.

▼M7

Anestésicos e analgésicos:

— doses anestésicas tópicas e analgésicas sistémicas administradas e respetiva cronologia;

— em caso de utilização de anestésicos locais, identificação, grau de pureza, tipo e interação potencial com o produto químico em estudo.

Resultados:

— descrição do método utilizado para pontuar a irritação em cada observação (por exemplo: lâmpada de fenda portátil, biomicroscópio, fluoresceína);

— quadro dos dados de reação irritante/corrosiva correspondentes a cada animal e a cada observação, até o animal ser retirado do ensaio;

— descrição pormenorizada do grau e da natureza da irritação ou corrosão observada;

— descrição de quaisquer outras lesões oculares observadas (por exemplo: vascularização, formação de pano da córnea, aderências, coloração);

— descrição de efeitos adversos não-oculares locais e sistémicos, registo de sinais clínicos de dor ou sofrimento, fotografias digitais e observações histopatológicas, se for caso disso.

Discussão dos resultados.

Interpretação dos resultados

A extrapolação, para seres humanos, de resultados de estudos de irritação ocular em animais de laboratório tem algumas limitações de validade. Em muitos casos, o coelho albino é mais sensível do que o ser humano a produtos químicos irritantes ou corrosivos oculares.

A interpretação dos dados deve ser cuidadosa, para excluir qualquer irritação resultante de infeções secundárias.

REFERÊNCIAS

1) Barratt, M.D., *et al.* (1995). The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard. ECVAM Workshop Report 8. *ATLA*, 23, 410--429.

2) de Silva, O., *et al.* (1997). Evaluation of Eye Irritation Potential: Statistical Analysis and Tier Testing Strategies. *Food Chem. Toxicol.*, 35, 159-164.

3) Worth, A.P., Fentem, J.H. (1999). A general approach for evaluating stepwise testing strategies. *ATLA*, 27, 161-177.

4) Young, J.R., *et al.* (1988). Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. *Toxicol. In Vitro*, 2, 19-26.

5) Neun, D.J. (1993). Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH. *J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol.*, 12, 227--231.

6) Fentem, J.H., *et al.* (1998). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. *Toxicology in vitro*, 12, 483-524.

7) Capítulo B.4 deste anexo, «Toxicidade aguda: irritação/corrosão dérmica»

▼M7

8) OCDE (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment, No. 19 (http://www.oecd.org/ehs/ /test/monos.htm).

9) Wright, E.M., Marcella, K.L., Woodson, J.F (1985). Animal pain: evaluation and control. *Lab Animal*, maio/junho, 20-36.

10) National Research Council (NRC) (2008). Recognition and Alleviation of Distress in Laboratory Animals. Washington, DC, The National Academies Press.

11) National Research Council (NRC) (2009). Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals. Washington, DC, The National Academies Press.

12) ICCVAM (2010). ICCVAM Test Method Evaluation Report: Recommendations for Routine Use of Topical Anesthetics, Systemic Analgesics, and Humane Endpoints to Avoid or Minimize Pain and Distress in Ocular Safety Testing. NIH Publication No. 10-7514. Research Triangle Park, NC, USA, National Institute of Environmental Health Sciences

(http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/OcuAnest- TMER.htm).

13) Capítulo B.40 deste anexo, «Corrosão da pele *in vitro*: ensaio da resistência elétrica transcutânea (RET)»

14) Capítulo B.40.A deste anexo, «Corrosão da pele *in vitro*: ensaio em modelos de pele humana»

15) OCDE (2006). *Test No. 435: In vitro Membrane Barrier Test Method for Skin corrosion*. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. OCDE, Paris.

16) Capítulo B.47 deste anexo, «Método de ensaio de opacidade e permeabilidade da córnea em bovinos para identificação de produtos químicos indutores de lesões oculares graves e de produtos químicos que não necessitem de ser classificados em termos de irritação ocular nem de lesões oculares graves»

17) Capítulo B.48 deste anexo, «Método de ensaio em olhos de frango isolados para identificação de produtos químicos indutores de lesões oculares graves e de produtos químicos que não necessitem de ser classificados em termos de irritação ocular nem de lesões oculares graves»

18) U.S. EPA (2003). Label Review Manual, 3.ª edição, EPA737-B-96-001. Washington, DC, Agência de Protecção do Ambiente dos E.U.A.

19) ONU (2011). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Quarta edição, revista. Nova Iorque e Genebra, Publicações das Nações Unidas.

20) Regulamento (CE) n.º 1272/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16 de dezembro de 2008, relativo à classificação, rotulagem e embalagem de substâncias e misturas, que altera e revoga as Diretivas 67/548/CEE e 1999/45/CE, e altera o Regulamento (CE) n.º 1907/2006. (JO L 353 de 31.12.2008, p. 1).

21) ECHA Guidance on information requirements and chemical safety assessment, Chapter R.7a: Endpoint specific guidance

(http://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_ r7a_en.pdf).

▼M7

Quadro 1

Graduação de lesões oculares

Córnea	Grau
Opacidade: grau de densidade (as medições devem ser efetuadas na zona mais densa) (*)	
Sem ulceração nem opacidade	0
Zonas de opacidade dispersas ou difusas (excluídas as perdas ligeiras do lustro normal); detalhes da íris claramente visíveis	1
Zona translúcida claramente discernível; detalhes da íris ligeiramente obscurecidos	2
Zona nacarada; nenhum detalhe da íris visível; tamanho da pupila dificilmente discernível	3
Córnea opaca; íris não discernível através da opacidade	4
Máximo possível: 4	
Íris	
Normal	0
Rugas acentuadamente mais profundas, congestão, tumefação, hiperemia pericorneal moderada ou injeção da conjuntiva; íris reativa à luz (uma reação lenta é considerada efeito positivo)	1
Hemorragia, destruição acentuada ou ausência de reação à luz	2
Máximo possível: 2	
Conjuntivas	
Vermelhidão (nas conjuntivas palpebral e bulbar, não na córnea nem na íris)	
Normal	0
Alguns vasos sanguíneos com hiperemia (injetados)	1
Cor carmesim difusa; vasos individuais não claramente discerníveis	2
Cor vermelho-carne difusa	3
Máximo possível: 3	
Quemose	
Tumefação (das pálpebras e/ou das membranas nictantes)	
Normal	0
Tumefação ligeiramente superior ao normal	1
Tumefação evidente, com eversão parcial das pálpebras	2
Tumefação, com as pálpebras semicerradas	3
Tumefação, com as pálpebras mais do que semicerradas	4
Máximo possível: 4	

(*) Anotar a zona de opacidade da córnea.

▼M7

Apêndice

DEFINIÇÕES

Reserva ácida/alcalina: No caso das preparações ácidas, é a quantidade de hidróxido de sódio, em gramas, necessária por 100 g de preparação para obter um determinado pH. No caso das preparações alcalinas, é a quantidade de hidróxido de sódio, em gramas, equivalente à massa, em gramas, de ácido sulfúrico necessária por 100 g de preparação para obter um determinado pH (Young *et al.*, 1988).

Produto químico: Substância ou mistura.

Não-irritante: Substância não classificada nas categorias I, II ou III de irritantes oculares da EPA, nem nas categorias 1, 2, 2A ou 2B de irritantes oculares do sistema GHS da ONU, nem nas categorias 1 ou 2 da UE (17) (18) (19).

Corrosivo ocular: a) Produto químico que provoca lesões irreversíveis nos tecidos do olho; b) Produto químico classificado na categoria 1 de irritantes oculares do sistema GHS da ONU, na categoria I de irritantes oculares da EPA ou na categoria 1 da UE (17) (18) (19).

Irritante ocular: a) Produto químico que provoca alterações reversíveis no olho; b) Produto químico classificado nas categorias II ou III de irritantes oculares da EPA, nas categorias 2, 2A ou 2B de irritantes oculares do sistema GHS da ONU ou na categoria 2 da UE (17) (18) (19).

Irritante ocular severo: a) Produto químico que provoca lesões nos tecidos do olho que não desaparecem nos 21 dias após a aplicação ou que provoca uma degradação grave da visão; b) Produto químico classificado na categoria 1 de irritantes oculares do sistema GHS da ONU, na categoria I de irritantes oculares da EPA ou na categoria 1 da UE (17) (18) (19).

Produto químico em estudo: Qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado este método de ensaio.

Abordagem sequencial por etapas: Estratégia sequencial de ensaio em que, seguindo uma ordem estabelecida, se avalia toda a informação disponível sobre o produto químico em estudo, por um processo baseado na ponderação da suficiência da prova em cada etapa, com o objetivo de determinar se há informação suficiente para uma decisão de classificação de perigosidade antes de passar à etapa seguinte. Se a informação existente possibilitar a atribuição de um potencial de irritação ao produto químico em estudo, não serão necessários mais ensaios. Se a informação existente não possibilitar a atribuição de um potencial de irritação ao produto químico em estudo, procede-se a uma série de ensaios sequenciais em animais até ser possível atribuir uma classificação inequívoca.

Ponderação da suficiência da prova: Processo que consiste em ponderar os pontos fortes e os pontos fracos de um conjunto de informações para tirar conclusões que podem não ser extraíveis dos dados individuais.

▼M7

SUPLEMENTO AO MÉTODO DE ENSAIO B.5 [1]

ESTRATÉGIA DE ENSAIO SEQUENCIAL PARA IRRITAÇÃO E CORROSÃO OCULARES

Aspetos gerais

Tendo em vista o melhor interesse científico e o bem-estar animal, importa evitar a utilização desnecessária de animais e minimizar os ensaios que neles possam causar reações severas. Antes de se ponderar a realização de ensaios *in vivo*, devem ser analisadas todas as informações disponíveis sobre o produto químico com importância para as potencialidades de irritação/corrosão ocular do mesmo. Pode dar-se o caso de existirem já dados suficientes para classificar o produto químico em estudo em termos do seu potencial irritante ou corrosivo ocular, sem necessidade de realizar ensaios em animais de laboratório. O recurso a uma análise de ponderação da suficiência da prova e a uma estratégia de ensaio sequencial minimizará, portanto, a necessidade de ensaios *in vivo*, especialmente no caso dos produtos químicos suscetíveis de produzir reações severas.

Recomenda-se o recurso a uma análise de ponderação da suficiência da prova para avaliar a informação existente sobre irritação e corrosão oculares causadas por produtos químicos e para determinar se a caracterização do potencial de irritação e corrosão oculares exige a realização de estudos adicionais, que não estudos oculares *in vivo*. No caso de serem necessários estudos adicionais, recomenda-se uma estratégia de ensaio sequencial para obter os dados experimentais relevantes. No caso das substâncias que nunca tenham sido ensaiadas, também deve ser utilizada a dita estratégia sequencial para obter os dados necessários à avaliação da capacidade irritante e da corrosividade oculares da substância. A estratégia de ensaio inicial descrita neste suplemento foi elaborada por um grupo de trabalho da OCDE (1). Foi subsequentemente confirmada e ampliada no sistema harmonizado e integrado de classificação dos perigos das substâncias químicas para a saúde humana e para o ambiente, aprovado na 28.ª sessão conjunta do comité dos produtos químicos e do grupo de trabalho «Produtos Químicos» realizada em novembro de 1998 (2), e atualizada por um grupo de peritos da OCDE em 2011.

Apesar de não fazer parte do método de ensaio B.5, esta estratégia de ensaio expressa a metodologia recomendada para a determinação de propriedades de irritação/corrosão ocular. Esta metodologia representa, não só as melhores práticas, mas também uma referência ética para os ensaios *in vivo* de irritação/corrosão ocular. O método de ensaio dá orientações para a realização de ensaios *in vivo* e resume os fatores a ter em conta antes de a ponderar. A estratégia de ensaio sequencial compreende uma metodologia de ponderação da suficiência da prova, para avaliar os dados já existentes sobre as propriedades de irritação/corrosão oculares de produtos químicos, e uma abordagem sequencial por etapas, para obter os dados necessários sobre os produtos químicos que careçam de estudos adicionais ou que nunca tenham sido estudados. A estratégia inclui, primeiro, a realização de ensaios *in vitro* ou *ex vivo* validados e reconhecidos e, em seguida, a realização de estudos segundo o método de ensaio B.4, adaptados às circunstâncias específicas (3) (4).

Descrição da estratégia de ensaio por etapas

Antes de realizar ensaios integrados na estratégia de ensaio sequencial (ver o quadro infra), deve avaliar-se, com base nas informações disponíveis, se são ou não necessários ensaios oculares *in vivo*. Embora possam obter-se informações significativas avaliando isoladamente determinados parâmetros (por exemplo um

[1] Para pôr em prática uma estratégia de ensaio integrada relativamente à irritação ocular no âmbito do Regulamento REACH, ver igualmente o capítulo R.7a, «*Endpoint specific guidance*», do documento *Guidance on information requirements and chemical safety assessment* da Agência Europeia dos Produtos Químicos (ECHA): http://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r7a_en.pdf

▼M7

pH extremo), importa examinar todas as informações existentes. Para uma decisão baseada na ponderação da suficiência da prova, devem ser avaliados todos os dados relevantes sobre os efeitos do produto químico, bem como dos análogos estruturais deste, e deve fundamentar-se a decisão tomada. Devem ser privilegiados os dados já existentes sobre os efeitos do produto químico em pessoas e animais, seguindo-se os resultados de ensaios *in vitro* ou *ex vivo*. Sempre que possível, devem evitar-se estudos *in vivo* de produtos químicos corrosivos. Fatores considerados na estratégia de ensaio:

Avaliação dos dados já existentes sobre efeitos no ser humano e/ou em animais e/ou dos dados obtidos por métodos *in vitro* validados reconhecidos internacionalmente (1.ª etapa)

Uma vez que fornecem informações diretamente relacionadas com os efeitos nos olhos, os primeiros dados a ter em conta devem ser os já existentes sobre efeitos no ser humano — por exemplo, de estudos clínicos e de medicina no trabalho e de relatórios de casos clínicos — e/ou dados de estudos realizados em animais por meio de ensaios oculares e/ou dados *in vitro* obtidos por métodos validados reconhecidos internacionalmente, relativos a irritação/corrosão ocular. Em seguida, devem ser avaliados os dados disponíveis de estudos de investigação da irritação/corrosão dérmica no ser humano e/ou em animais e/ou de estudos *in vitro* de corrosão da pele, obtidos por métodos validados reconhecidos internacionalmente. Não devem instilar-se nos olhos de animais produtos químicos que, reconhecidamente, tenham efeitos corrosivos ou causem irritação severa nos olhos nem produtos químicos com efeitos corrosivos ou de irritação severa na pele, os quais se deve considerar que também têm efeitos corrosivos ou de irritação severa nos olhos. Também não se devem ensaiar em estudos oculares *in vivo* produtos químicos relativamente aos quais estudos oculares realizados anteriormente comprovem suficientemente não terem efeitos corrosivos nem irritantes nos olhos.

Análise de relações estrutura-atividade (REA) (2.ª etapa)

Devem ser tidos em conta os resultados disponíveis de ensaios de produtos químicos estruturalmente afins. Se houver dados suficientes, indicativos de irritação/corrosão oculares no ser humano e/ou em animais, sobre produtos químicos estruturalmente afins ou misturas dos mesmos, pode presumir-se que o produto químico em estudo gerará as mesmas reações. Nestes casos, pode não ser necessário ensaiar o produto químico. Dados negativos obtidos em estudos de produtos químicos estruturalmente afins ou de misturas do mesmos não constituem prova suficiente da inexistência de efeitos corrosivos/irritantes do produto químico sujeito à estratégia de ensaio sequencial. As metodologias baseadas em relações estrutura-atividade a que se recorra para identificar possíveis efeitos corrosivos e irritantes na pele e nos olhos devem estar validadas e ser reconhecidas.

Propriedades físico-químicas e reatividade química (3.ª etapa)

Os produtos químicos com pH extremo (≤ 2,0 ou ≥ 11,5) podem ter efeitos locais fortes. Se a identificação do caráter corrosivo ou irritante do produto químico ao nível ocular tiver por base um pH extremo, pode também ter-se em conta a reserva ácida/alcalina (poder de tamponamento) do produto químico em causa (5) (6) (7). Se o poder de tamponamento indiciar que o produto químico pode não ser corrosivo para os olhos (produtos químicos com pH extremo, mas reserva ácida/alcalina baixa), devem ser realizados ensaios adicionais para o confirmar, de preferência recorrendo a ensaios *in vitro* ou *ex vivo* validados e reconhecidos (ver o ponto 10).

Consideração de outras informações existentes (4.ª etapa)

Nesta etapa, devem ser avaliadas todas as informações disponíveis sobre toxicidade sistémica por via dérmica. Deve também considerar-se a toxicidade dérmica aguda do produto químico em estudo. Se tiver sido demonstrado que o produto químico em estudo é muito tóxico por via dérmica, pode não ser necessário realizar ensaios oculares do mesmo. Apesar de não haver necessariamente relação

▼M7

entre toxicidade dérmica aguda e irritação/corrosão ocular, pode considerar-se que um agente muito tóxico por via dérmica também será muito tóxico quando instilado nos olhos. Dados deste tipo também podem ser examinados entre a 2.ª e a 3.ª etapas.

Avaliação da corrosividade dérmica do produto químico, se também necessário por exigências normativas (5.ª etapa)

Começa por se avaliar se o produto químico corrói a pele ou causa efeitos de irritação severa na pele pelo método de ensaio B.4 (4) e tendo em conta o suplemento apenso (8), preconizando-se o recurso a métodos de ensaio *in vitro* de corrosão da pele validados e reconhecidos internacionalmente (9) (10) (11). Se, comprovadamente, tiver efeitos corrosivos ou de irritação severa na pele, pode também considerar-se que o produto químico é corrosivo para os olhos ou gera irritação severa nos olhos, não sendo necessários ensaios complementares. Se o produto químico não corroer a pele nem gerar irritação severa na pele, deve efetuar-se um ensaio ocular *in vitro* ou *ex vivo*.

Resultados de ensaios *in vitro* ou *ex vivo* (6.ª etapa)

Não é necessário ensaiar em animais produtos químicos que se tenham revelado corrosivos ou geradores de irritação severa em ensaios *in vitro* ou *ex vivo* (12) (13) validados e reconhecidos internacionalmente para avaliar especificamente a corrosão/irritação ocular. Pode considerar-se que esses produtos químicos terão efeitos igualmente severos *in vivo*. Se não se dispuser de ensaios *in vitro*/*ex vivo* validados e reconhecidos, passa-se diretamente da 5.ª para a 7.ª etapas.

Ensaios *in vivo* no coelho (7.ª e 8.ª etapas)

O ensaio ocular *in vivo* deve começar por um ensaio inicial num único animal. Se os resultados desse ensaio indicarem que o produto químico provoca irritação severa nos olhos ou os corrói, deve pôr-se termo ao ensaio. Se o ensaio não revelar nenhum efeito corrosivo nem de irritação severa, deve efetuar-se um ensaio de confirmação noutros dois animais. Consoante os resultados do ensaio de confirmação, poderão ou não ser necessários ensaios complementares. [Ver o método de ensaio B.5.]

▼M7

ESTRATÉGIA DE ENSAIO E AVALIAÇÃO DE IRRITAÇÃO/CORROSÃO OCULAR

	Atividade	Observação	Conclusão
1	Dados já existentes sobre efeitos no ser humano e/ou em animais, e/ou dados *in vitro* obtidos por métodos validados reconhecidos internacionalmente, revelam efeitos oculares	Lesões oculares severas	Critério decisivo; considerar corrosivo ocular. Não são necessários ensaios.
		Irritação ocular	Critério decisivo; considerar irritante ocular. Não são necessários ensaios.
		Ausência de corrosão/irritação ocular	Critério decisivo; considerar não-corrosivo e não-irritante ocular. Não são necessários ensaios.
	Dados já existentes sobre efeitos no ser humano e/ou em animais, e/ou dados *in vitro* obtidos por métodos validados reconhecidos internacionalmente, revelam efeitos corrosivos na pele	Corrosão da pele	Corrosivo ocular presumível. Não são necessários ensaios.
	Dados já existentes sobre efeitos no ser humano e/ou em animais, e/ou dados *in vitro* obtidos por métodos validados reconhecidos internacionalmente, revelam efeitos irritantes severos na pele	Irritação severa da pele	Irritante ocular presumível. Não são necessários ensaios.
	↓		
	Informação indisponível ou a informação disponível não é conclusiva		
	↓		
2	Análise de relações estrutura-atividade para avaliar irritação/corrosão ocular	Previsão de lesões oculares severas	Corrosivo ocular presumível. Não são necessários ensaios.
		Previsão de irritação ocular	Irritante ocular presumível. Não são necessários ensaios.
	Ponderação da análise de relações estrutura-atividade para avaliar corrosão da pele	Previsão de corrosão da pele	Corrosivo ocular presumível. Não são necessários ensaios.
	↓		
	Não é possível fazer previsões ou as previsões são inconclusivas ou negativas		
	↓		
3	Medição do pH (e do poder de tamponamento, se for caso disso)	pH ≤ 2 ou ≥ 11,5 (com elevado poder de tamponamento, se for caso disso)	Corrosivo ocular presumível. Não são necessários ensaios.
	↓		
	2 < pH < 11,5; ou pH ≤ 2,0 ou ≥ 11,5, mas com baixo ou nenhum poder de tamponamento, se for caso disso		
	↓		
4	Exame dos dados existentes de toxicidade sistémica por via dérmica	Elevada toxicidade às concentrações que seriam utilizadas no ensaio ocular.	Produto químico demasiado tóxico para ser ensaiado. Não são necessários ensaios.

▼M7

	Atividade	Observação	Conclusão
	↓		
	Informação indisponível ou o produto químico não é muito tóxico		
	↓		
5	Avaliação experimental do poder corrosivo na pele recorrendo à estratégia de ensaio descrita no capítulo B.4 deste anexo, se também necessário por exigências normativas	Reação corrosiva ou de irritação severa	Corrosivo ocular presumível. Não são necessários mais ensaios.
	↓		
	O produto químico não corrói a pele nem provoca irritação severa da pele		
	↓		
6	Realização de um ou mais ensaios oculares *in vitro* ou *ex vivo* validados e reconhecidos	Reação corrosiva ou de irritação severa	Corrosivo ocular ou irritante ocular severo presumível, desde que o ensaio realizado seja utilizável na identificação de produtos químicos corrosivos/irritantes severos e o produto químico esteja dentro do domínio de aplicabilidade do ensaio. Não são necessários mais ensaios.
		Reação de irritação	Irritante ocular presumível, desde que o ensaio ou ensaios realizados sejam utilizáveis na correta identificação de produtos químicos corrosivos, irritantes severos e irritantes e o produto químico esteja dentro do domínio de aplicabilidade do(s) ensaio(s). Não são necessários mais ensaios.
		Ausência de irritação	Não-irritante ocular presumível, desde que o ensaio ou ensaios realizados sejam utilizáveis na correta identificação de produtos químicos não-irritantes, distinguindo-os corretamente de produtos químicos irritantes, irritantes severos e corrosivos oculares, e o produto químico esteja dentro do domínio de aplicabilidade do(s) ensaio(s). Não são necessários mais ensaios.
	↓		
	Para chegar a uma conclusão, não é possível recorrer a um ou mais ensaios oculares in vitro ou ex vivo validados e reconhecidos		
	↓		

▼M7

	Atividade	Observação	Conclusão
7	Realização de um ensaio ocular *in vivo* inicial num único coelho	Lesões oculares severas	Considerar corrosivo ocular. Não são necessários mais ensaios.
	↓		
	Não ocorrem lesões severas ou não há reação		
	↓		
8	Realização de um ensaio de confirmação noutro coelho ou noutros dois coelhos	Corrosão ou irritação	Considerar corrosivo ou irritante ocular. Não são necessários mais ensaios.
		Ausência de corrosão e de irritação	Considerar não-irritante e não-corrosivo ocular. Não são necessários mais ensaios.

REFERÊNCIAS

1) OCDE (1996). OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Realizado em Solna, Suécia, de 22 a 24 de janeiro de 1996 (http://www.oecd.org/ehs/test/background.htm).

2) OCDE (1998). Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, novembro de 1998 (http://www.oecd.org/ehs/Class/ /HCL6.htm).

3) Worth, A.P., Fentem, J.H. (1999). A General Approach for Evaluating Stepwise Testing Strategies. *ATLA*, 27, 161-177.

4) Capítulo B.4 deste anexo, «Toxicidade aguda: irritação/corrosão dérmica»

5) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth, W.M.H. (1988). Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. *Toxicol. In Vitro*, 2, 19-26.

6) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Edsail, D.J., Holzhutter, H.G., Liebsch, M. (1998). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. *Toxicology in vitro*, 12, pp. 483--524.

7) Neun, D.J. (1993). Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH. *J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol.*, 12, 227--231.

8) Suplemento ao capítulo B.4 deste anexo, «Uma Estratégia de Ensaio Sequencial para a Irritação e Corrosão Dérmica»

9) Capítulo B.40 deste anexo, «Corrosão da pele *in vitro*: Ensaio da resistência elétrica transcutânea (RET)»

10) Capítulo B.40-A deste anexo, «Corrosão da pele *in vitro*: Ensaio em modelos de pele humana»

11) OCDE (2006). *Test No. 435: In vitro Membrane Barrier Test Method for Skin corrosion*. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. OCDE, Paris.

▼**M7**

12) Capítulo B.47 deste anexo, «Método de ensaio de opacidade e permeabilidade da córnea em bovinos para identificação de produtos químicos indutores de lesões oculares graves e de produtos químicos que não necessitem de ser classificados em termos de irritação ocular nem de lesões oculares graves»

13) Capítulo B.48 deste anexo, «Método de ensaio em olhos de frango isolados para identificação de produtos químicos indutores de lesões oculares graves e de produtos químicos que não necessitem de ser classificados em termos de irritação ocular nem de lesões oculares graves»

▼B

B.6. **SENSIBILIZAÇÃO CUTÂNEA**

1. **MÉTODO**

1.1. INTRODUÇÃO

Observações

A sensibilidade e capacidade dos métodos de ensaio para detectar substâncias que possam induzir sensibilização cutânea considera-se importante num sistema de classificação em matéria de toxicidade no domínio da saúde pública.

Não existe um método único que permita identificar de modo adequado todas as substâncias que possuam um potencial de sensibilização cutânea para o homem.

Na selecção do método de ensaio devem ter-se em conta factores tais como as características físicas da substância, nomeadamente a sua capacidade de penetração na pele.

Desenvolveram-se dois tipos de ensaios em porquinhos-da-índia: ensaios com adjuvantes, em que a reacção alérgica é desencadeada por uma solução ou suspensão da substância em estudo em «adjuvante completo de Freunds», e os ensaios sem adjuvantes.

Em geral, os ensaios com adjuvantes permitem determinar o potencial de sensibilização cutânea no homem com mais precisão que os métodos que não utilizam o «adjuvante completo de Freunds», pelo que são preferíveis.

O ensaio de maximização em porquinhos-da-índia constitui um método com adjuvante largamente utilizado. Embora possam utilizar-se vários outros métodos para determinar o potencial de sensibilização cutânea, o método em causa é considerado o mais adequado.

Os ensaios sem adjuvantes (de que o ensaio de Buehler constitui o mais popular) são considerados menos sensíveis quando aplicados a determinadas classes de substâncias.

Em alguns casos, podem existir motivos para a selecção do ensaio de Buehler, em que se procede à aplicação tópica, em vez do método de maximização em porquinhos-da-índia, que utiliza a injecção intradérmica. No caso do recurso ao método de Buehler, deve fornecer-se a respectiva justificação.

O presente método descreve o ensaio de maximização em porquinhos-da-índia e o método de Buehler. Pode recorrer-se a outros métodos devidamente validados cuja utilização seja cientificamente justificada.

Se um ensaio de despiste reconhecido fornecer um resultado positivo, a substância submetida ao ensaio pode ser designada potencialmente sensibilizante e pode não ser necessário efectuar subsequentemente um ensaio com cobaias. No entanto, se o referido ensaio fornecer um resultado negativo, é necessário efectuar um ensaio com cobaias segundo a metodologia aplicável ao presente método de ensaio.

Ver também a parte B da Introdução Geral.

▼B

1.2. DEFINIÇÕES

Sensibilização cutânea (dermatite de contacto alérgica): reacção cutânea, de origem imunológica, a uma determinada substância. No homem, a reacção pode incluir pruridos, eritrema, edema, pápulas, vesículas, bolhas ou uma combinação dos mesmos. Em outras espécies, as reacções podem diferir, embora apenas se observe eritrema e edema.

Exposição de indução: exposição experimental de um indivíduo a uma substância em estudo, com o objectivo de induzir uma reacção de hipersensibilidade.

Período de indução: período de, pelo menos, uma semana após a exposição de indução, durante o qual pode surgir uma reacção de hipersensibilidade.

Exposição de desencadeamento: exposição experimental a uma determinada substância, após o período de indução, de um indivíduo previamente exposto à mesma, de modo a averiguar uma eventual reacção de hipersensibilidade.

1.3. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

A sensibilidade e a fiabilidade da técnica experimental utilizada devem ser determinadas semestralmente por recurso a substâncias que se saiba possuírem propriedades de sensibilização cutânea ligeiras ou moderadas.

Num ensaio realizado de forma adequada, a utilização de um sensibilizante ligeiro ou moderado deve determinar uma reacção de pelo menos 30 %, no caso de um ensaio com adjuvante, e de pelo menos 15 % no caso de um ensaio sem adjuvante.

Recomenda-se a utilização das substâncias seguintes:

Número CAS	Número EINECS	Denominação EINECS	Denominação comum
101-86-0	202-983-3	α-Hexilcinamaldeído	α-Hexilcinamaldeído
149-30-4	205-736-8	Benzotiazolo-2-tiol (mercaptobenzotiazolo)	Kaptax
94-09-7	202-303-5	Benzocaína	Norcaína

Em determinados casos devidamente justificados podem utilizar-se outras substâncias que satisfaçam os critérios atrás referidos.

1.4. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

Os animais utilizados são inicialmente expostos à substância em estudo por injecção intradérmica e/ou aplicação epidérmica (exposição de indução). Após um período de repouso de 14 dias (período de indução), durante o qual poderá observar-se uma reacção imunitária, os animais são expostos a uma dose de desencadeamento. A extensão e o grau da reacção cutânea à exposição de desencadeamento nos animais do lote de ensaio é comparada com a reacção observada nos animais do lote de controlo, sujeitos a um produto inactivo na fase da indução e objecto da exposição de desencadeamento.

1.5. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

Caso se afigure aconselhável a remoção da substância em estudo, deve utilizar-se para tal água ou um solvente adequado que não altere a reacção observada, bem como a integridade da epiderme.

▼B

1.5.1. *Ensaio de maximização nos porquinhos-da-índia*

1.5.1.1. Preparação

Os animais (porquinhos-da-índia albinos adultos, jovens e saudáveis) são aclimatados às condições laboratoriais durante, pelo menos, cinco dias. Antes do ensaio, procede-se à respectiva distribuição aleatória por lotes. O pêlo é removido com o auxílio de uma tesoura ou lâmina ou, eventualmente, por depilação química, de acordo com o método utilizado. Deve evitar-se produzir feridas. Os animais são pesados antes do início do ensaio e após o respectivo termo.

1.5.1.2. Condições de ensaio

1.5.1.2.1. Animais de ensaio

Os animais devem ser porquinhos-da-índia albinos de utilização corrente em laboratório.

1.5.1.2.2. Número e sexo

Podem utilizar-se animais de ambos os sexos. Caso se utilizem fêmeas, estas devem ser nulíparas e não grávidas.

Utiliza-se um mínimo de 10 animais no lote de ensaio e um mínimo de cinco animais no lote de controlo. Caso se utilizem menos de 20 animais no lote de ensaio e menos de 10 animais no lote de controlo, não é possível concluir a natureza sensibilizante do produto, pelo que se recomenda vivamente a realização de ensaios com outros animais, até atingir os números referidos.

1.5.1.2.3. Doses

A concentração de substância em estudo utilizada em cada exposição por indução deve apresentar uma boa tolerância sistémica e corresponder à concentração máxima que produz uma irritação cutânea ligeira a moderada. A concentração utilizada na exposição de desencadeamento deve consistir na dose máxima não irritante. Se necessário, as concentrações adequadas podem ser determinadas a partir de um estudo-piloto utilizando dois ou três animais. Para tal, devem utilizar-se animais objecto de ensaio com «adjuvante completo de Freunds».

1.5.1.3. Procedimento

1.5.1.3.1. Indução

Dia 0 — lote de ensaio

Administram-se três pares de injecções intradérmicas de 0,1 ml na região da espádua.

1.ª injecção: mistura «adjuvante completo de Freunds»/água ou soro fisiológico (1:1) (v/v).

2.ª injecção: substância em estudo dissolvida num veículo adequado, na concentração escolhida.

3.ª injecção: substância em estudo dissolvida numa mistura «adjuvante completo de Freunds»/água ou soro fisiológico (1:1) (v/v), na concentração escolhida.

Na 3.ª injecção, as substâncias hidrossolúveis são dissolvidas na fase aquosa antes da mistura com «adjuvante completo de Freunds». As substâncias lipossolúveis ou insolúveis são suspensas em «adjuvante completo de Freunds» antes de adicionadas à fase aquosa. A concentração final da substância em estudo deve ser igual à utilizada na 2.ª injecção.

▼B

As 1.ª e 2.ª injecções são administradas em regiões vizinhas, tão próximas quanto possível do crânio, enquanto que a 3.ª injecção é administrada na parte posterior da zona de ensaio.

Dia 0 — lote de controlo

Administram-se três pares de injecções intradérmicas de 0,1 ml na mesma região usada no caso dos animais do lote de ensaio.

1.ª injecção: mistura «adjuvante completo de Freunds»/água ou soro fisiológico (1:1) (v/v).

2.ª injecção: veículo não diluído.

3.ª injecção: mistura a 50 % (m/v) do veículo numa mistura «adjuvante completo de Freunds»/água ou soro fisiológico (1:1) (v/v).

5.º-7.º dias — lotes de ensaio e de controlo

No caso de a substância não constituir um irritante cutâneo, a zona de ensaio, com o pêlo previamente removido, é tratada, cerca de 24 horas antes da aplicação tópica de indução, com 0,5 ml de solução a 10 % de laurilssulfato de sódio em vaselina, de modo a produzir irritação local.

6.º-8.º dias — lote de ensaio

O pêlo é novamente removido da zona de ensaio. Impregna-se totalmente uma folha de papel de filtro (2 × 4 cm) da substância em estudo, dissolvida ou suspensa num veículo adequado, que se aplica na zona de ensaio, sendo mantida em contacto com a mesma durante 48 horas, com o auxílio de um penso oclusivo. Deve justificar-se a escolha do veículo utilizado. Os sólidos devem ser finamente divididos e incorporados num veículo adequado. Os líquidos podem ser aplicados directamente, se for caso disso.

6.º-8.º dias — lote de controlo

O pêlo é novamente removido da zona de ensaio. O veículo é aplicado de modo análogo ao anteriormente descrito, sendo também mantido em contacto com a referida zona durante 48 horas, com o auxílio de um penso oclusivo.

1.5.1.3.2. Desencadeamento

20.º-22.º dias — lotes de ensaio e de controlo

Remove-se o pêlo do flanco dos animais dos lotes de ensaio e de controlo. Aplica-se num dos flancos de cada animal um apósito ou uma câmara impregnados da substância em estudo; se necessário, pode aplicar-se no outro flanco um apósito ou uma câmara impregnados do veículo. Os sistemas em causa são mantidos em contacto com a pele com o auxílio de um penso oclusivo.

1.5.1.3.3. Observação e avaliação: lotes de ensaio e de controlo

— Cerca de 21 horas após a remoção do apósito ou da câmara, a zona em estudo é limpa, sendo o pêlo removido com o auxílio de uma tesoura ou lâmina, se necessário.

— Cerca de 3 horas depois (ou seja, cerca de 48 horas após o início do ensaio), observa-se a reacção cutânea, que se regista de acordo com a escala indicada no apêndice.

— Cerca de 24 horas após a primeira observação (72 horas após o início do ensaio), procede-se a um novo exame, cujos resultados se registam de modo análogo.

Recomenda-se a realização de leituras cegas com os animais dos lotes de ensaio e de controlo.

Caso seja necessário clarificar os resultados obtidos no primeiro ensaio de desencadeamento, pode realizar-se um segundo ensaio com um novo lote de controlo, cerca de uma semana depois. Pode também realizar-se um segundo ensaio de desencadeamento com o mesmo lote de controlo.

▼B

Devem observar-se e registar-se de acordo com a escala de Magnusson/Kligman (ver apêndice) todas as reacções anormais, nomeadamente reacções sistémicas, resultantes dos processos de indução e desencadeamento. Além disso, podem efectuar-se outros exames, nomeadamente um exame histopatológico ou uma determinação da espessura da prega cutânea, com o objectivo de clarificar eventuais reacções duvidosas.

1.5.2. *Ensaio de Buehler*

1.5.2.1. Preparação

Os animais (porquinhos-da-índia albinos adultos, jovens e saudáveis) são aclimatados às condições laboratoriais durante, pelo menos, cinco dias. Antes do ensaio, procede-se à respectiva distribuição aleatória por lotes. O pêlo é removido com o auxílio de uma tesoura ou lâmina ou, eventualmente, por depilação química, de acordo com o método utilizado. Deve evitar-se produzir feridas. Os animais são pesados antes do início do ensaio e após o respectivo termo.

1.5.2.2. Condições de ensaio

1.5.2.2.1. Animais de ensaio

Os animais devem ser porquinhos-da-índia albinos de utilização corrente em laboratório.

1.5.2.2.2. Número e sexo

Podem utilizar-se animais de ambos os sexos. Caso se utilizem fêmeas, estas últimas devem ser nulíparas e não grávidas.

Utiliza-se um mínimo de 20 animais no lote de ensaio e um mínimo de 10 animais no lote de controlo.

1.5.2.2.3. Doses

A concentração de substância em estudo utilizada em cada exposição por indução deve corresponder à concentração máxima que produz uma irritação cutânea moderada. A concentração utilizada na exposição de desencadeamento deve consistir na dose máxima não irritante. Se necessário, as concentrações adequadas podem ser determinadas a partir de um estudo-piloto utilizando dois ou três animais.

No caso de as substâncias em estudo serem hidrossolúveis, deve utilizar-se como veículo água ou uma solução diluída de um tensioactivo não irritante. Nos restantes casos, o veículo deve consistir numa mistura etanol/água a 80 % (ensaios de indução) ou acetona (ensaios de desencadeamento).

1.5.2.3. Procedimento

1.5.2.3.1. Indução

Dia 0 — lote de ensaio

Remove-se o pêlo do flanco dos animais. O sistema de apósito é impregnado da substância em estudo, dissolvida ou suspensa num veículo adequado (deve justificar-se a escolha do veículo; as substâncias líquidas podem ser aplicadas sem diluição, se for caso disso)

e aplicado na zona de ensaio, sendo mantido em contacto com a mesma durante 6 horas, com o auxílio de um apósito ou de uma câmara e de um penso adequado.

▼B

O sistema de apósito utilizado deve ser oclusivo. Pode utilizar-se uma mecha de algodão de forma circular ou quadrada, com 4 a 6 cm^2. De modo a garantir a oclusão, é aconselhável utilizar um dispositivo de imobilização adequado. Caso se utilize uma faixa, poderá ser necessário proceder a exposições adicionais.

Dia 0 — lote de controlo

O pêlo é novamente removido da zona de ensaio. O veículo é aplicado de modo análogo ao anteriormente descrito, sendo também mantido em contacto com a referida zona durante 6 horas por intermédio de um penso oclusivo ou de uma câmara. Caso se conclua que não é necessário efectuar um controlo simulado, poderá efectuar-se um controlo mais simples.

6.º-8.º dias e 13.º-15.º dias — lotes de ensaio e de controlo

A substância em estudo é aplicada de modo análogo ao anteriormente descrito, na mesma zona e no mesmo flanco (se necessário, proceder à remoção do pêlo), entre o 6.º e o 8.º dias e, de novo, entre o 13.º e o 15.º dias.

1.5.2.3.2. Desencadeamento

27.º-29.º dias — lotes de ensaio e de controlo

Remove-se o pêlo do flanco posterior dos animais dos lotes de ensaio e de controlo não sujeito a exposição prévia e aplica-se um penso oclusivo ou câmara impregnados da quantidade adequada da substância em estudo (concentração máxima não irritante).

Se necessário, pode também aplicar-se um penso oclusivo ou câmara, impregnados do veículo, ao flanco anterior dos animais de ambos os lotes não sujeito a exposição prévia. Os pensos ou câmaras são mantidos em contacto com a pele durante 6 horas, com o auxílio de um dispositivo adequado.

1.5.2.3.3. Observação e avaliação

— Cerca de 21 horas após a remoção do apósito ou da câmara, remove-se o pêlo da área em estudo.

— Cerca de 3 horas depois (ou seja, cerca de 30 horas após o início do ensaio), observa-se a reacção cutânea, que se regista de acordo com a escala indicada em apêndice.

— Cerca de 24 horas após a primeira observação (54 horas após o início do ensaio), procede-se a um novo exame, cujos resultados se registam de modo análogo.

Recomenda-se a realização de leituras cegas com os animais dos lotes de ensaio e de controlo.

Caso seja necessário clarificar os resultados obtidos no primeiro ensaio de desencadeamento pode realizar-se um segundo ensaio com um novo lote de controlo, cerca de uma semana depois. Pode também realizar-se um segundo ensaio de desencadeamento com o mesmo lote de controlo.

▼B

Devem observar-se e registar-se de acordo com a escala de Magnusson/Kligman (ver apêndice) todas as reacções anormais, nomeadamente reacções sistémicas, resultantes dos processos de indução e desencadeamento. Além disso, podem efectuar-se outros exames, nomeadamente um exame histopatológico ou uma determinação da espessura da prega cutânea, com o objectivo de clarificar eventuais reacções duvidosas.

2. **DADOS (GPMT E ENSAIO DE BUEHLER)**

Os dados devem ser apresentados de forma sumária num quadro, referindo, para cada animal, a reacção cutânea observada.

3. **RELATÓRIO (GPMT E ENSAIO DE BUEHLER)**

Caso se tenha realizado um ensaio de prospecção (por exemplo, ensaio ganglionar local — LLNA — ou ensaio de tumefacção do pavilhão auditivo no ratinho — METS) antes do ensaio em porquinhos-da-índia, deve fornecer-se, juntamente com os resultados obtidos com a substância em estudo e a substância de referência, detalhes relativos ao procedimento.

Relatório do ensaio (ensaio de maximização em porquinhos da índia e ensaio de Buehler)

O relatório do ensaio deve incluir, sempre que possível, as seguintes informações:

Animais utilizados no ensaio:

— estirpe;

— número, idade e sexo dos animais;

— proveniência, condições de alojamento, dieta administrada, etc.;

— massa de cada animal no início do ensaio.

Condições de ensaio:

— pormenores relativos à preparação da zona de ensaio;

— pormenores relativos aos materiais e técnicas de apósito utilizadas;

— resultados dos estudos-piloto destinados a determinar as concentrações de indução e de desencadeamento utilizadas no ensaio;

— pormenores relativos à preparação, aplicação e remoção da substância em estudo;

— justificação da escolha do veículo;

— concentrações do veículo e da substância em estudo utilizadas nos ensaios de indução e de desencadeamento; quantidade total de substância aplicada nos ensaios de indução e de desencadeamento.

Resultados:

— resumo dos resultados do último controlo de sensibilidade e fiabilidade (ver 1.3), nomeadamente informações sobre a substância, a respectiva concentração e o veículo utilizado;

▼B

— dados relativos a cada animal, incluindo o sistema de classificação;

— descrição da natureza e gravidade dos efeitos observados;

— dados histopatológicos.

Discussão dos resultados.

Conclusões.

4. **REFERÊNCIAS**

O presente método é análogo ao método OCDE TG 406.

▼B

Apêndice

QUADRO

Escala de Magnusson/Kligman para a avaliação das reacções ao ensaio de desencadeamento

0 = alterações não visíveis;

1 = eritrema discreto ou localizado;

2 = eritrema moderado ou confluente;

3 = eritrema intenso e tumefacção.

▼M4

B.7. ESTUDO DA TOXICIDADE ORAL POR DOSE REPETIDA DURANTE 28 DIAS EM ROEDORES

INTRODUÇÃO

1. Este método é equivalente ao *Test Guideline* 407 (2008) da OCDE. O *Test Guideline* 407 inicial foi adotado em 1981. Em 1995, adotou-se uma versão revista, para obter mais dados sobre os animais estudados, nomeadamente ao nível da neurotoxicidade e da imunotoxicidade.

2. Em 1998, a OCDE deu início a uma ação prioritária com vista à revisão dos *Test Guidelines* existentes e à elaboração de novos *Test Guidelines* para despistagem e ensaio de potenciais desreguladores do sistema endócrino (8). Um dos elementos dessa ação foi a atualização do *Test Guideline* da OCDE relativo ao estudo da toxicidade oral por dose repetida durante 28 dias em roedores (TG 407), nele introduzindo parâmetros adequados à deteção da atividade endócrina de produtos químicos. O protocolo adotado foi então sujeito a um vasto programa internacional destinado a examinar a pertinência e viabilidade desses parâmetros adicionais, o desempenho dos mesmos relativamente a produtos químicos com atividade (anti)estrogénica, (anti)androgénica e (anti)tiroideia, a repetibilidade intralaboratorial e a reprodutibilidade interlaboratorial e as interferências dos novos parâmetros com os anteriormente previstos no TG 407. A OCDE elaborou em seguida um relatório muito completo (9) com a compilação e avaliação pormenorizada dos múltiplos dados obtidos nesse exercício. A presente atualização do método B.7 equivale ao TG 407 e é fruto da experiência e dos resultados obtidos durante o referido programa internacional. O método permite contextualizar determinados efeitos de mediação endócrina com outros efeitos toxicológicos.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES

3. Na apreciação e avaliação das características de toxicidade de produtos químicos, pode determinar-se a toxicidade oral por dose repetida depois de obter informações sobre a toxicidade aguda a partir de ensaios realizados para o efeito. Este método destina-se ao estudo de efeitos tóxicos numa grande diversidade de alvos potenciais de toxicidade. Fornece informações sobre os perigos para a saúde que podem advir da exposição repetida num período relativamente curto, nomeadamente ao nível de efeitos nos sistemas nervoso, imunitário e endócrino. Nestes domínios específicos, pretende-se identificar os produtos químicos potencialmente neurotóxicos, passíveis de justificar o aprofundamento do estudo desta vertente, bem como os que interferem com a fisiologia da tiroide, podendo o método fornecer igualmente dados sobre os produtos químicos que afetam os órgãos reprodutores de animais adultos jovens de ambos os sexos e dar indicações sobre efeitos imunológicos.

4. Os resultados obtidos por este método podem ser utilizados na identificação de perigos e na avaliação de riscos. Os resultados correspondentes aos parâmetros relacionados com o sistema endócrino devem interpretar-se com base no documento "*Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals*" (11), elaborado pela OCDE, que estabelece um quadro conceptual para o ensaio e a avaliação de produtos químicos desreguladores do sistema endócrino. O método compreende um estudo básico de toxicidade por dose repetida, que pode utilizar-se para produtos químicos que não justifiquem um estudo a 90 dias (por exemplo, se o volume de produção não exceder determinados limites) ou como etapa prévia para um estudo a longo prazo. O tempo de exposição previsto é de 28 dias.

▼M4

5. O programa internacional de validação de parâmetros adequados para a deteção da atividade endócrina potencial de produtos químicos mostrou que a qualidade dos dados obtidos pelo método B.7 depende muito da experiência do laboratório que realiza os ensaios. Este problema coloca-se especificamente em relação à determinação histopatológica de alterações cíclicas dos órgãos reprodutores femininos e à pesagem dos pequenos órgãos hormonodependentes, difíceis de dissecar. Foi elaborado um documento de orientações no domínio da histopatologia (19), que está disponível no sítio Web público da OCDE relativo aos *Test Guidelines* e visa ajudar os patologistas nos exames que realizam e contribuir para melhorar a sensibilidade do ensaio. Foram incorporados neste método diversos parâmetros que se verificou constituírem indicadores de efeitos tóxicos ao nível endócrino. Enumeram-se no apêndice 2, como parâmetros facultativos, aqueles cuja utilidade não está provada, por insuficiência de dados, ou cujo contributo para a deteção de desreguladores do sistema endócrino o programa de validação não demonstrou suficientemente.

6. Com base nos dados gerados no processo de validação, importa sublinhar que a sensibilidade deste ensaio não é suficiente para identificar todas as substâncias (anti)androgénicas ou (anti)estrogénicas (9). O método não é aplicado a um estádio da vida especialmente sensível à desregulação endócrina. Todavia, durante o processo de validação, identificaram-se por este método substâncias que afetam ligeira ou fortemente a função tiroideia e substâncias com atividade endócrina moderada a forte através dos recetores estrogénicos ou androgénicos, embora raramente tenha sido possível identificar substâncias com fraca atividade a esse nível. Não pode, portanto, considerar-se um ensaio de despistagem de atividade endócrina.

7. O facto de não se evidenciarem efeitos de natureza (anti)androgénica ou (anti)estrogénica não pode, portanto, entender-se como uma prova da inexistência de efeitos no sistema endócrino. No que respeita a efeitos mediados pelo sistema endócrino, a caracterização das substâncias não deve, pois, basear-se unicamente nos resultados obtidos por aplicação deste método de ensaio. Para caracterizar uma potencial atividade endócrina, estes resultados devem ser examinados juntamente com todos os dados disponíveis para o produto químico em causa, numa perspetiva de suficiência de prova. Por conseguinte, as decisões normativas sobre atividade endócrina (ao nível da caracterização de substâncias) devem fundamentar-se numa base mais alargada, não se apoiando unicamente nos resultados obtidos pelo presente método.

8. Pressupõe-se que todos os procedimentos com animais respeitarão as normas locais de manipulação de animais. As descrições, neste protocolo, dos cuidados a ter com os animais e do tratamento a dar aos animais são normas mínimas, prevalecendo, se for mais estrita, a regulamentação local. Para mais orientações sobre o tratamento ético de animais, ver o documento da OCDE com a referência 14.

9. Definem-se no apêndice 1 alguns conceitos utilizados.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

10. Administra-se diariamente por via oral o produto químico em estudo a vários grupos de animais, em doses crescentes de grupo para grupo, durante um período de 28 dias. No decurso deste período, verifica-se atentamente todos os dias se os animais evidenciam sinais de toxicidade. Autopsia-se os animais que morrem ou são eutanasiados durante os ensaios. No final dos ensaios, eutanasiam-se e autopsia-se os animais sobreviventes. Este estudo durante 28 dias fornece informações sobre os efeitos da exposição repetida por via oral e pode revelar a necessidade de estudos complementares mais

▼M4

longos. Pode igualmente fornecer informações que facilitem a escolha das concentrações a utilizar nesses estudos durante períodos mais longos. Os dados gerados pela aplicação deste método devem possibilitar a caracterização da toxicidade do produto químico estudado, fornecer indicações sobre a resposta às doses administradas e permitir determinar o NOAEL (nível sem observação de efeitos adversos).

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Escolha da espécie animal

11. Embora possa recorrer-se a outros roedores, a espécie preferida é o rato. Se os parâmetros especificados neste método forem estudados noutra espécie de roedor, é necessário justificá-lo pormenorizadamente. Embora, em termos biológicos, seja plausível que outras espécies respondam aos produtos tóxicos de modo semelhante ao rato, o recurso a espécies mais pequenas pode aumentar a variabilidade, devido às dificuldades técnicas que a dissecação dos órgãos mais pequenos coloca. O rato foi a única espécie utilizada no programa internacional de validação da deteção de desreguladores do sistema endócrino. Devem ser utilizados animais adultos, jovens e saudáveis de estirpes laboratoriais correntes. As fêmeas utilizadas devem ser nulíparas e não podem estar grávidas. A administração do produto químico em estudo deve ter início logo que possível após o desmame, mas sempre antes de os animais completarem nove semanas. No início do estudo, as diferenças de peso entre os animais utilizados devem ser mínimas, não se desviando mais de 20 % do peso médio de cada sexo. Se o estudo de toxicidade oral por dose repetida constituir uma etapa preliminar de um estudo a longo prazo, devem ser utilizados animais da mesma estirpe e proveniência em ambos os casos.

Condições de alojamento e de alimentação

12. Todos os procedimentos devem respeitar as normas locais de manipulação de animais de laboratório. A temperatura do biotério deve ser de 22 °C (± 3 °C). A humidade relativa não deve ser inferior a 30 % e, de preferência, não deve exceder 70 %, exceto durante a limpeza do biotério. Idealmente, deve procurar manter-se entre 50 % e 60 %. A iluminação deve ser artificial, com uma sequência de 12 horas de luz seguidas de 12 horas de escuridão. Na alimentação, podem utilizar-se dietas convencionais de laboratório e deve ser fornecida água de beber sem restrições. Se o produto químico em estudo for administrado com os alimentos, a escolha da dieta pode ser condicionada pela necessidade de assegurar uma mistura adequada. Os animais devem ser alojados em pequenos grupos do mesmo sexo, embora possam ser alojados individualmente se houver razões científicas que o justifiquem. Em caso de alojamento coletivo, cada gaiola não deve alojar mais de cinco animais.

13. Deve efetuar-se com regularidade uma pesquisa de contaminantes nos alimentos fornecidos e conservar-se uma amostra da dieta até o relatório estar concluído.

Preparação dos animais

14. Distribuem-se aleatoriamente animais adultos, jovens e saudáveis pelos grupos de controlo e pelos grupos expostos. As gaiolas devem ser dispostas de forma a minimizar possíveis efeitos derivados do seu posicionamento. Os animais devem ser identificados individualmente e permanecer nas gaiolas durante, pelo menos, cinco dias antes do início do ensaio, para aclimatação às condições laboratoriais.

Preparação das doses

15. Administra-se o produto químico em estudo por meio de uma sonda esofágica ou através da dieta ou da água de beber. O método de administração oral depende do objetivo do estudo, bem como das propriedades físico-químicas e toxicocinéticas do produto químico em causa.

▼M4

16. Se necessário, pode suspender-se ou dissolver-se o produto químico em estudo num veículo apropriado. Recomenda-se que, sempre que possível, a primeira opção seja uma solução ou suspensão aquosa; caso tal não seja viável, pode optar-se por uma solução ou suspensão num óleo (por exemplo, em óleo de milho); em último caso, poderá recorrer-se a uma solução noutro veículo. Se o veículo utilizado não for água, é necessário conhecer as suas características de toxicidade. Deve determinar-se a estabilidade do produto químico em estudo no veículo utilizado.

PROCEDIMENTO

Número e sexo dos animais

17. Para cada dose, devem ser utilizados, pelo menos, 10 animais (cinco machos e cinco fêmeas). Se estiver prevista a realização de eutanásias intercalares, os efetivos devem ser aumentados no número de animais a eutanasiar antes da conclusão do estudo. Deve ponderar-se a constituição de um grupo satélite de dez animais (cinco de cada sexo) paralelamente ao grupo de controlo e ao grupo exposto à dose mais elevada, a fim de observar a reversibilidade, a persistência e o aparecimento diferido de efeitos tóxicos durante, pelo menos, 14 dias após o termo da exposição.

Dosagem

18. Em geral, devem ser utilizados pelo menos três grupos de ensaio e um grupo de controlo. Porém, se, após a avaliação de outros dados, não for de prever nenhum efeito com a dose de 1 000 mg/kg de peso corporal/dia, pode efetuar-se um ensaio do limite. Se não se dispuser de dados adequados para o efeito, pode efetuar-se um estudo exploratório, com animais da mesma estirpe e proveniência, para facilitar a determinação das doses a utilizar. Salvo no que respeita à exposição ao produto químico em estudo, os animais do grupo de controlo devem ser tratados do mesmo modo que os animais dos grupos ensaiados. Se for utilizado um veículo para administrar o produto químico em estudo, o grupo de controlo deve receber o volume máximo de veículo utilizado.

19. Na escolha das doses devem ser tidos em conta os dados eventualmente disponíveis sobre a toxicidade e a toxicocinética do produto químico em estudo ou de produtos afins. Deve escolher-se como dose mais elevada uma dose que induza efeitos tóxicos, mas não cause mortalidade nem sofrimento intenso. Selecciona-se a seguir uma sequência decrescente de doses que permita correlacionar as respostas observadas com as doses administradas e cuja dose mais baixa não produza nenhum efeito adverso observável (NOAEL). O intervalo ótimo entre doses consecutivas é frequentemente definido por um fator de 2 a 4. A inclusão de um quarto grupo de ensaio é muitas vezes preferível ao uso de intervalos muito grandes (fatores superiores a 10) entre as dosagens.

20. Caso se observem sinais de toxicidade generalizada (por exemplo, redução do peso corporal, efeitos ao nível hepático, cardíaco, pulmonar ou renal, etc.) ou outras alterações que possam não ser reações tóxicas (por exemplo, diminuição da quantidade de alimentos ingerida, dilatação hepática, etc.), deverá interpretar-se com cautela qualquer efeito observado ao nível dos parâmetros imunológicos, neurológicos ou endócrinos.

Ensaio do limite

21. Se o ensaio, realizado de acordo com o presente método, de uma dose não inferior a 1 000 mg/kg de peso corporal/dia ou, no caso da administração através da dieta ou da água de beber, de uma percentagem equivalente administrada através desses veículos (com base nos pesos corporais determinados) não produzir efeitos tóxicos observáveis e, tendo em conta dados referentes a substâncias estruturalmente afins, não forem de prever efeitos tóxicos, pode considerar-se que não é necessário efetuar um estudo completo com três doses. Nesses casos, justifica-se a realização de um ensaio do limite, exceto se os dados relativos à exposição humana aconselharem o ensaio de doses superiores.

▼M4

Administração das doses

22. Administra-se diariamente a dose prevista do produto químico em estudo aos animais durante 28 dias. A administração forçada por meio de uma sonda esofágica deve efetuar-se numa dose única, utilizando um tubo estomacal ou uma cânula de intubação adequada. O volume máximo de líquido que pode ser administrado de cada vez depende do tamanho do animal, não devendo exceder 1ml/100 g de peso corporal; excetuam-se as soluções aquosas, que podem ser administradas na proporção de 2 ml/100 g de peso corporal. Para minimizar as diferenças entre os volumes administrados, devem ser efetuados ajustes nas concentrações, de forma que o volume seja o mesmo para todas as doses; excetuam-se os ensaios de produtos químicos irritantes ou corrosivos, cujos efeitos são normalmente exacerbados a concentrações mais elevadas.

23. É importante assegurar que as quantidades do produto químico em estudo administradas através da dieta ou da água de beber não interferem na nutrição normal nem no equilíbrio hídrico. Se o produto químico em estudo for incorporado na dieta, pode optar-se por concentrações constantes nesta (ppm) ou por doses constantes em relação ao peso corporal de cada animal, devendo indicar-se a opção tomada. No caso dos produtos químicos administrados por sonda esofágica, a dose deve ser administrada todos os dias à mesma hora, devendo ser ajustada sempre que necessário para manter uma relação constante entre a dose administrada e o peso corporal do animal. Se o ensaio de toxicidade oral por dose repetida constituir uma etapa preliminar de um estudo a longo prazo, a dieta deve ser a mesma em ambos os casos.

Exames

24. O período de observação é de 28 dias. Os animais incluídos nos grupos satélites destinados a continuarem a ser observados devem ser mantidos durante, pelo menos, mais 14 dias sem administração do produto químico em estudo, para deteção do aparecimento diferido, da persistência ou da reversibilidade de efeitos tóxicos.

25. Pelo menos uma vez por dia, deve efetuar-se um exame clínico geral, de preferência sempre à(s) mesma(s) hora(s) e tendo em conta o período previsto de efeitos mais acentuados após a administração do produto químico em estudo, registando o estado de saúde dos animais. Pelo menos duas vezes por dia, verificam-se os casos de morbidez ou mortalidade no conjunto dos animais.

26. Deve efetuar-se um exame clínico aprofundado a cada animal antes da primeira exposição (para poder fazer depois comparações com o estado inicial do animal) e, posteriormente, pelo menos uma vez por semana. Estes exames devem ser realizados fora das gaiolas, num recinto normalizado, de preferência sempre à mesma hora. Os resultados destes exames devem ser cuidadosamente registados, de preferência por recurso a um sistema de pontuação claramente definido pelo laboratório em causa. Deve zelar-se por que as condições de ensaio sejam o mais constantes possível e os exames devem ser efetuados, de preferência, por pessoal que não esteja a par do ensaio realizado. Entre os sinais a registar contam-se alterações da pele, da pelagem, dos olhos e das mucosas e a ocorrência de secreções, excreções ou reações neurovegetativas (por exemplo, lacrimação, horripilação, alterações da dimensão pupilar ou respiração anormal). Deve também registar-se qualquer alteração da maneira de o animal se mover, da postura e da reação à manipulação, bem como a ocorrência de movimentos clónicos ou tónicos e de comportamentos estereotipados (por exemplo, atos de higiene repetitivos ou movimentação repetitiva em círculo) ou estranhos (automutilação, movimentação para trás, etc.) (2).

27. Na quarta semana de exposição deve determinar-se a reação sensorial a diversos tipos de estímulos (2) (nomeadamente auditivos, visuais e proprioceptivos) (3)(4)(5) e avaliar-se a força de preensão (6) e a atividade motora (7). As referências indicadas contêm mais informações sobre a maneira de proceder em cada caso, embora possam adotar-se procedimentos distintos dos nelas descritos.

▼M4

28. Se o estudo constituir uma etapa preliminar de um estudo ulterior de toxicidade subcrónica (a 90 dias), podem ser omitidos os exames funcionais previstos para a quarta semana. Nesse caso, os exames funcionais devem realizar-se durante o estudo subsequente. Não obstante, os dados de exames funcionais realizados durante o estudo por dose repetida podem facilitar a escolha das doses a utilizar no estudo ulterior de toxicidade subcrónica.

29. Como segunda exceção, também podem omitir-se os exames funcionais no caso dos grupos de animais que apresentem sinais de toxicidade cuja intensidade interferiria de modo significativo com esses exames.

30. Na autópsia, pode determinar-se (facultativamente) a fase do ciclo estral de cada fêmea por meio de um esfregaço vaginal. Este exame fornece informações sobre a fase do ciclo estral no momento da eutanásia do animal e facilita a avaliação histológica dos tecidos sensíveis aos estrogénios – ver as orientações sobre histopatologia (19).

Peso corporal e consumo de alimentos e de água

31. Todos os animais devem ser pesados pelo menos uma vez por semana. O consumo de alimentos deve ser medido pelo menos uma vez por semana. Se o produto químico em estudo for administrado através da água de beber, o consumo de água também deve medir-se pelo menos uma vez por semana.

Hematologia

32. No final do período de ensaio, devem determinar-se os seguintes parâmetros hematológicos: hematócrito, concentração de hemoglobina, contagem de eritrócitos, reticulócitos, contagem total de leucócitos e fórmula leucocitária, contagem de plaquetas e tempo e potencial de coagulação. Caso o produto químico em estudo ou os seus metabolitos potenciais tenham, ou se suspeite que tenham, propriedades oxidantes, devem ser efetuadas outras análises, nomeadamente a determinação da concentração de meta-hemoglobina e de corpos de Heinz.

33. As colheitas de sangue devem ser efetuadas num ponto determinado a indicar, imediatamente antes da eutanásia dos animais ou integradas nesta, e as amostras devem ser armazenadas em condições adequadas. Os animais devem jejuar na noite anterior à eutanásia ([1]).

Bioquímica clínica

34. Recorrendo a amostras de sangue de cada animal, colhidas imediatamente antes da eutanásia ou durante esta (com exceção dos animais moribundos e/ou eutanasiados antes do termo do estudo), devem ser efetuadas determinações bioquímicas clínicas destinadas a investigar os principais efeitos tóxicos nos tecidos, nomeadamente aos níveis renal e hepático. Os parâmetros a determinar no plasma ou no soro são os seguintes: sódio, potássio, glucose, colesterol total, ureia, creatinina, proteínas totais e albumina, pelo menos duas enzimas indicadoras de efeitos hepatocelulares (tais como a alanina-aminotransferase, a aspartato-aminotransferase, a fosfatase alcalina, a gama-glutamil-transpeptidase e a glutamato-desidrogenase) e os ácidos biliares. Em determinados casos, a determinação de outras enzimas (de origem hepática ou outra origem) e da bilirrubina pode fornecer informações úteis.

35. A título facultativo, podem realizar-se na última semana do estudo as seguintes determinações na urina, utilizando amostras recolhida em momentos determinados: aspeto, volume, osmolalidade ou densidade, pH, proteínas, glucose e sangue/hematócitos.

([1]) No caso de algumas determinações no soro e no plasma, nomeadamente da glucose, é aconselhável que os animais jejuem durante a noite. O principal motivo desta recomendação reside no facto de que a maior variabilidade dos resultados que inevitavelmente ocorreria se os animais não jejuassem poderia ocultar efeitos subtis e dificultar as interpretações. No entanto, por outro lado, o jejum durante a noite pode interferir no metabolismo geral dos animais e, particularmente nos estudos realizados com administração pela via alimentar, perturbar a exposição diária ao produto químico em estudo. Caso se opte pelo jejum durante a noite, as análises bioquímicas devem ser efetuadas após os exames funcionais previstos para a quarta semana do estudo.

▼M4

36. Deve ainda prever-se a pesquisa no plasma ou no soro de marcadores de lesões gerais dos tecidos. Caso as propriedades conhecidas do produto químico em estudo afetem, ou se suspeite de que possam afetar, determinadas vias metabólicas, devem realizar-se outras determinações, nomeadamente as seguintes: cálcio, fosfatos, triglicéridos, hormonas específicas e colinesterase. A necessidade de efetuar estas determinações é estabelecida para certas classes de produtos químicos ou é avaliada para cada caso concreto.

37. Embora na avaliação internacional dos parâmetros endócrinos não tenha ficado demonstrado ser claramente vantajoso determinar as hormonas tiroideias (T3 e T4) e a TSH, pode ser útil conservar amostras de plasma ou de soro para determinar (facultativamente) a T3, a T4 e a TSH, caso surjam indícios de efeitos no eixo hipofisotiroideio. Estas amostras podem ser congeladas a -20 °C para serem armazenadas. Os fatores a seguir indicados podem afetar a variabilidade dos resultados das análises hormonais e as concentrações absolutas nelas determinadas:

— momento da eutanásia, devido à variação das concentrações hormonais ao longo do dia,

— método utilizado para eutanasiar os animais sem lhes causar tensões desnecessárias, que poderiam afetar as concentrações hormonais,

— diferenças ao nível das curvas de calibração dos conjuntos (*kit*s) para as determinações hormonais.

É mais fiável recorrer a uma análise histopatológica do que à determinação de níveis harmonias para identificar inequivocamente os produtos químicos com atividade na tiroide.

38. As amostras de plasma especificamente destinadas a determinações hormonais devem colher-se à mesma hora do dia. Recomenda-se que se pondere a realização das análises da T3, da T4 e da TSH com base nas alterações histopatológicas detetadas na tiroide. Os conjuntos (*kits*) existentes no comércio para determinar concentrações hormonais podem dar valores diferentes. Pode, portanto, não ser possível estabelecer critérios de desempenho baseados em dados históricos homogéneos. Em alternativa, os laboratórios devem procurar manter os coeficientes de variação para efeitos de controlo abaixo de 25, no caso dos parâmetros T3 e T4, e abaixo de 35, no caso do parâmetro TSH. As concentrações devem ser registadas em ng/ml.

39. Se os dados históricos de base forem inadequados, deve ponderar-se a determinação da variabilidade dos parâmetros hematológicos e de bioquímica clínica antes de iniciar a exposição dos animais às doses previstas ou – o que será preferível – num conjunto de animais não incluídos nos grupos ensaiados.

PATOLOGIA

Autópsia macroscópica

40. Deve ser realizada a todos os animais estudados uma autópsia macroscópica completa e pormenorizada através do exame cuidadoso da superfície exterior do corpo, dos orifícios, das cavidades craniana, torácica e abdominal e do conteúdo de cada uma destas. Removem-se convenientemente os tecidos aderentes ao fígado, aos rins, às glândulas suprarrenais, aos testículos, aos epidídimos, ao conjunto formado pela próstata, pelas vesículas seminais e pelas glândulas coagulantes, ao timo, ao baço, ao encéfalo e ao coração de todos os animais (exceto os moribundos e os que sejam eutanasiados antes do termo do estudo) e pesa-se cada um destes ainda húmido o mais rapidamente possível depois da dissecação, para evitar que seque. Ao remover os tecidos aderentes ao complexo prostático, há que tomar precauções para não perfurar as vesículas seminais, que têm líquido no interior. Em alternativa, podem remover-se os tecidos aderentes à próstata e às vesículas seminais e efetuar a pesagem depois de fixar estes órgãos.

▼M4

41. A título facultativo, podem pesar-se dois outros tecidos – para evitar que sequem, também o mais rapidamente possível depois da dissecação: os dois ovários (ainda húmidos) e o útero, incluindo o colo do útero – o documento TG 440 da OCDE (18) contém orientações sobre a dissecação e a preparação dos tecidos uterinos para a pesagem].

42. A pesagem (facultativa) da tiroide deve realizar-se após fixação. A remoção dos tecidos aderentes à tiroide deve efetuar-se com muito cuidado e também só depois da fixação, para evitar danificar tecidos – que, a ocorrer, poderia comprometer a análise histopatológica.

43. Os tecidos a seguir indicados devem conservar-se no meio de fixação mais adequado ao tipo de tecido e ao exame histopatológico previsto (ver o ponto 47): todas as lesões macroscópicas, o encéfalo (regiões representativas, incluindo os hemisférios cerebrais, o cerebelo e a protuberância anelar), a medula espinal, os olhos, o estômago, o intestino delgado e o intestino grosso (incluindo as placas de Peyer), o fígado, os rins, as glândulas suprarrenais, o baço, o coração, o timo, a tiroide, a traqueia e os pulmões (conservados por injeção de fixador, seguida de imersão), as gónadas (testículos e ovários), os órgãos sexuais secundários (útero e colo do útero, epidídimos, próstata + vesículas seminais e glândulas de coagulação), a vagina, a bexiga urinária, os gânglios linfáticos – o gânglio linfático mais próximo e outro gânglio linfático, a selecionar em função da experiência anterior do laboratório (15) –, um nervo periférico (ciático ou tibial), de preferência na vizinhança do músculo, músculo esquelético e osso com medula óssea (corte ou, em alternativa, uma punção recente de medula óssea). Recomenda-se a fixação dos testículos por imersão em fixador de Bouin ou em fixador de Davidson modificado (16)(17). Para que o fixador penetre rapidamente, deve puncionar-se superficialmente a túnica albugínea com uma agulha, com cuidado, em ambos os polos do órgão. Os resultados clínicos e outros podem aconselhar o exame de outros tecidos. Devem conservar-se também todos os órgãos que as propriedades conhecidas do produto químico em estudo indiciem que serão provavelmente afetados.

44. Os seguintes tecidos podem dar indicações úteis sobre efeitos ao nível do sistema endócrino: gónadas (ovários e testículos), órgãos sexuais secundários (útero, incluindo o colo do útero, epidídimos, vesículas seminais e glândulas de coagulação, bem como a próstata dorsolateral e ventral), vagina, hipófise, glândulas mamárias masculinas, tiroide e glândulas suprarrenais. Não há documentação suficiente de alterações das glândulas mamárias masculinas, mas este parâmetro pode ser muito sensível às substâncias com atividade estrogénica. A observação dos órgãos e tecidos não especificados no ponto 43 é facultativa (ver o apêndice 2).

45. O documento com a referência 19, que contém orientações no domínio da histopatologia, dá mais informações sobre a dissecação, a fixação, a colheita de amostras e a histopatologia de tecidos do sistema endócrino.

46. No programa de ensaios internacional obtiveram-se alguns indícios de que é possível detetar efeitos endócrinos subtis de produtos químicos capazes de afetar ligeiramente a homeostase das hormonas sexuais, não tanto com base em alterações histopatológicas claras dos órgãos sexuais femininos, mas sim através das perturbações que aqueles provocam na sincronização do ciclo estral em diversos tecidos. Embora esses efeitos careçam de prova definitiva, recomenda-se que, na interpretação do exame histopatológico dos ovários (células foliculares, tecais e da granulosa), do útero, do colo do útero e da vagina, se tenham em conta eventuais indícios de assincronias do ciclo estral. Caso se determine o estádio do ciclo por meio de esfregaços vaginais, este dado pode ser tido em conta como elemento comparativo suplementar.

▼M4

Histopatologia

47. Deve efetuar-se um exame histopatológico completo dos órgãos e tecidos conservados de todos os animais dos grupos de controlo e do grupo que recebeu a dose mais elevada. Caso o exame dos animais deste último grupo revele alterações atribuíveis à dose do produto químico em estudo, devem examinar-se também os animais de todos os outros grupos a que foram administradas doses do produto químico.

48. Devem examinar-se todas as lesões macroscópicas.

49. Caso se tenha constituído um grupo satélite de animais, deve efetuar-se o exame histopatológico dos tecidos e órgãos que tenham revelado alterações nos animais dos grupos expostos a uma dose do produto químico em estudo.

DADOS E RELATÓRIOS

Dados

50. Devem ser apresentados todos os dados individuais. Os dados devem ainda ser resumidos num quadro, indicando, para cada grupo estudado, o número de animais no início do ensaio, o número de animais que morreram durante o ensaio ou que foram eutanasiados, a hora de cada morte ou eutanásia, o número de animais que apresentaram sinais de toxicidade, os sinais de toxicidade observados, nomeadamente o momento do seu aparecimento e a sua duração e intensidade, o número de animais que apresentaram lesões, o tipo e a intensidade destas e a percentagem de animais que apresentaram cada tipo de lesão.

51. Se possível, devem ser avaliados os resultados numéricos por um método estatístico corrente adequado. Na comparação de um efeito numa gama de doses, deve evitar-se o recurso a múltiplos testes t. Os métodos estatísticos devem ser escolhidos no planeamento do estudo.

52. Para fins de controlo de qualidade, propõe-se a compilação de dados de controlo históricos e o cálculo de coeficientes de variação dos dados numéricos, especialmente no caso dos parâmetros relacionados com a deteção de desreguladores do sistema endócrino. Estes dados podem ser utilizados para fins comparativos quando da avaliação de estudos reais.

Relatório dos ensaios

53. Elementos a constar do relatório dos ensaios:

Produto químico em estudo:

— natureza física, grau de pureza e propriedades físico-químicas,

— dados de identificação.

Veículo (se for o caso):

— justificação da escolha do veículo (se não for água).

Animais estudados:

— espécie e estirpe utilizadas,

— número, idade e sexo,

— proveniência, condições de alojamento, dieta, etc.,

— peso de cada animal no início do ensaio,

— caso não sejam utilizados ratos, justificação da utilização de outra espécie.

Condições de realização dos ensaios:

— fundamentação da escolha das doses,

— elementos relativos à formulação do produto químico em estudo/à incorporação do mesmo na dieta dos animais; concentração atingida, estabilidade e homogeneidade da preparação,

▼**M4**

— elementos relativos à administração do produto químico em estudo,

— se aplicável, equivalência entre a concentração do produto químico em estudo na dieta ou na água de beber, expressa em ppm, e a dose real, expressa em mg/kg de peso corporal/dia,

— elementos sobre a qualidade dos alimentos e da água.

Parâmetros facultativos examinados:

— lista desses parâmetros.

Resultados:

— pesos corporais e alterações de peso corporal,

— consumo de alimentos e de água, se aplicável,

— respostas tóxicas em função do sexo e da dose administrada, incluindo sinais de toxicidade,

— natureza, intensidade e duração dos sinais clínicos observados (reversíveis ou irreversíveis),

— dados relativos à atividade sensorial, à força de preensão e à atividade motora,

— resultados das análises hematológicas, acompanhados dos respetivos valores de base,

— resultados das análises bioquímicas, acompanhados dos respetivos valores de base,

— pesos corporais no momento da eutanásia e pesos dos órgãos,

— resultados das autópsias,

— descrição pormenorizada dos resultados do exame histopatológico,

— dados de absorção, se disponíveis,

— tratamento estatístico dos resultados, se for o caso.

Discussão dos resultados.

Conclusões.

▼M4

Apêndice 1

DEFINIÇÕES

Atividade antiandrogénica: capacidade de um produto químico de agir como hormona androgénica natural (por exemplo, a testosterona) num mamífero.

Atividade antiandrogénica: capacidade de um produto químico de suprimir a ação de uma hormona androgénica natural (por exemplo, a testosterona) num mamífero.

Atividade antiestrogénica: capacidade de um produto químico de suprimir a ação de uma hormona estrogénica natural (por exemplo, o estradiol 17ß) num mamífero.

Atividade antitiroideia: capacidade de um produto químico de suprimir a ação de uma hormona da tiroide natural (por exemplo, a T_3) num mamífero.

Dosagem: termo geral que abrange a dose, a frequência desta e o tempo de aplicação da mesma.

Dose: quantidade de produto químico em estudo administrada. Exprime-se em peso diário do produto químico por unidade de peso corporal do animal ensaiado (por exemplo, mg/kg de peso corporal/dia) ou sob a forma de uma concentração constante na dieta.

Toxicidade evidente: termo geral que descreve a existência de sinais claros de toxicidade após a administração do produto químico em estudo. Os sinais em causa devem ser suficientes para a avaliação dos perigos e devem ser tais que seja de prever que o aumento da dose administrada provoque o aparecimento de sinais intensos de toxicidade e provável mortalidade.

NOAEL: abreviatura de "*no observed adverse effect level*" ("nível sem observação de efeitos adversos"), que constitui a dose máxima que não produz efeitos adversos observáveis da exposição à mesma.

Atividade estrogénica: capacidade de um produto químico de agir como hormona estrogénica natural (por exemplo, o estradiol 17ß) num mamífero.

Produto químico em estudo: qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado este método de ensaio.

Atividade tiroideia: capacidade de um produto químico de agir como uma hormona da tiroide natural (por exemplo, a T_3) num mamífero.

Validação: processo científico concebido para caracterizar as limitações e os imperativos operacionais de um método de ensaio e para demonstrar a fiabilidade e pertinência do mesmo para um determinado fim.

▼M4

Apêndice 2

Parâmetros recomendados para a deteção de desreguladores do sistema endócrino pelo método B.7

Parâmetros obrigatórios	Parâmetros facultativos
Peso	
— Testículos — Epidídimos — Glândulas suprarrenais — Próstata + vesículas seminais e glândulas coagulantes	— Ovários — Útero, incluindo o colo do útero — Tiroide
Histopatologia	
— Gónadas — Testículos e — Ovários — Órgãos sexuais secundários: — Epidídimos — Próstata + vesículas seminais e glândulas coagulantes — Útero, incluindo o colo do útero — Glândulas suprarrenais — Tiroide — Vagina	— Esfregaço vaginal — Glândulas mamárias masculinas — Hipófise
Dosagens hormonais	
	— Níveis circulantes de T3 e T4 — Níveis circulantes de TSH

REFERÊNCIAS:

(1) OCDE (Paris, 1992). Chairman's Report of the Meeting of the *ad hoc* Working Group of Experts on Systemic Short-term and (Delayed) Neurotoxicity.

(2) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.

(3) Tupper D.E., Wallace R.B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. *Acta Neurobiol. Exp.* 40:999-1003.

(4) Gad S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. *J. Toxicol Environ. Health* 9:691-704.

(5) Moser V.C., McDaniel K.M., Phillips P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 108:267-283.

(6) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C., Riley M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. *Neurobehav. Toxicol.* 1:233-236.

▼M4

(7) Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. *Neurotoxicol. Teratol.* 13:599-609.

(8) OCDE (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10-11 de março de 1998. ENV/MC/CHEM/RA(98)5.

(9) OCDE (2006). Report of the Validation of the Updated Test Guideline 407: Repeat Dose 28-day Oral Toxicity Study in Laboratory Rats. Series on Testing and Assessment No. 59, ENV/JM/MONO(2006)26.

(10) OCDE (2002). Detailed Review Paper on the Appraisal of Test Methods for Sex Hormone Disrupting Chemicals. Series on Testing and Assessment No. 21, ENV/JM/MONO(2002)8.

(11) OCDE (2012). Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals. http://www.oecd.org/document/58/0,3343,fr_2649_37407_2348794_1_1_1_37407,00.html.

(12) OCDE (2006). Final Summary report of the meeting of the Validation Management Group for mammalian testing. ENV/JM/TG/EDTA/M(2006)2.

(13) OCDE. Draft Summary record of the meeting of the Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment. ENV/JM/TG/EDTA/M(2006)3.

(14) OCDE (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Series on Testing and Assessment No. 19. ENV/JM/MONO(2000)7.

(15) Haley P., Perry R., Ennulat D., Frame S., Johnson C., Lapointe J.-M., Nyska A., Snyder P.W., Walker D., Walter G. (2005). STP Position Paper: Best Practice Guideline for the Routine Pathology Evaluation of the Immune System. *Toxicol Pathol.* 33:404-407.

(16) Hess R.A., Moore B.J. (1993). Histological Methods for the Evaluation of the Testis. *In*: Methods in Reproductive Toxicology, Chapin R.E. e Heindel J.J. (eds.). Academic Press, San Diego, CA, p. 52-85.

(17) Latendresse J.R., Warbrittion A.R., Jonassen H., Creasy D.M. (2002) Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid. *Toxicol. Pathol.* 30:524--533.

(18) OCDE (2007). OECD Guideline for Testing of Chemicals N.º 440: Uterotrophic Bioassay in Rodents: A short-term screening test for oestrogenic properties.

(19) OCDE (2009). Guidance Document 106 on Histologic evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. ENV/JM/Mono(2009)11.

▼M4

B.8. TOXICIDADE SUBAGUDA POR INALAÇÃO: ESTUDO DE 28 DIAS

RESUMO

Este método revisto visa caracterizar integralmente a toxicidade por via inalatória do produto químico estudado, após exposição repetida por um período limitado (28 dias), e obter dados para quantificar os riscos por inalação. Expõem-se durante 28 dias, seis horas por dia, grupos constituídos por dez roedores machos e dez roedores fêmeas a três ou mais concentrações do produto químico em estudo (a), a ar filtrado (b, controlo negativo), e/ou ao veículo (c, controlo do veículo). Em geral, Os animais são expostos durante cinco dias por semana, mas admite-se que sejam expostos sete dias por semana. Ensaiam-se sempre machos e fêmeas, mas cada sexo pode ser exposto a concentrações diferentes, se um deles for reconhecidamente mais sensível ao produto químico do que o outro. Este método concede ao diretor do estudo flexibilidade suficiente para incluir grupos satélites (para apreciação da reversibilidade), lavagens broncoalveolares, testes neurológicos e exames histopatológicos e de patologia clínica suplementares, a fim de melhor caracterizar a toxicidade do produto químico em estudo.

INTRODUÇÃO

1. Este método é equivalente ao *Test Guideline* 412 (2009) da OCDE. O *Test Guideline* 412 (TG 412) inicial relativo à toxicidade subaguda por inalação foi adotado em 1981 (1). O presente método B.8 é equivalente ao método TG 412 revisto, tendo sido atualizado para refletir o estado da ciência e cumprir exigências atuais e futuras da regulamentação.

2. O método permite caracterizar os efeitos adversos resultantes da exposição diária por inalação, durante 28 dias, ao produto químico em estudo. Os dados gerados pelos estudos de toxicidade subaguda por inalação durante 28 dias podem ser utilizados para quantificar riscos (caso não se lhes siga um estudo de toxicidade subcrónica por inalação a 90 dias — capítulo B.29 deste anexo). Os dados gerados pelo presente método também podem ser úteis para a escolha das concentrações a utilizar em estudos mais prolongados, por exemplo, o estudo da toxicidade subcrónica por inalação a 90 dias. O método não se destina especificamente ao ensaio de nanomateriais. No final do capítulo e no documento de orientações n.º 39 (2) são definidos alguns conceitos utilizados neste método.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

3. A fim de melhorar a qualidade do estudo e de minimizar a utilização de animais, antes de realizar o estudo o laboratório de ensaios deve ponderar todas as informações disponíveis sobre o produto químico em causa. Entre os elementos úteis para a escolha das concentrações mais adequadas contam-se a identidade, a estrutura química e as propriedades físico-químicas do produto químico em estudo, resultados de ensaios de toxicidade *in vitro* ou *in vivo*, as utilizações previstas, o potencial de exposição humana, dados (Q)SAR — "*(quantitative) structure-activity relationships*", relações (quantitativas) estrutura/atividade — e toxicológicos disponíveis sobre produtos químicos estruturalmente afins e dados provenientes de ensaios de toxicidade aguda por inalação. Se estiver prevista a ocorrência ou ocorrerem manifestações de neurotoxicidade durante o estudo, fica ao critério do diretor deste incluir no estudo as avaliações suplementares que considere adequadas, tais como uma bateria de observações funcionais e determinações da atividade motora. Embora o momento da exposição possa ser um aspeto crítico em determinados exames, a realização destes estudos suplementares não deve interferir na conceção do estudo principal.

▼M4

4. No caso dos produtos químicos corrosivos ou irritantes, podem ser ensaiadas diluições adequadas, a concentrações que gerem o grau de toxicidade pretendido [ver o GD 39 (2)]. Ao expor animais a produtos químicos com tais características, as concentrações visadas devem ser suficientemente baixas para não causarem dor ou sofrimento intensos, sem deixarem de ser suficientes para que a curva de resposta à concentração abranja os níveis correspondentes aos objetivos do ensaio, nos planos científico e da regulamentação. Estas concentrações devem ser adaptadas a cada caso, de preferência com base num estudo exploratório convenientemente concebido, que forneça informações sobre o parâmetro crítico, eventuais limiares de irritação e o momento do aparecimento dos efeitos (ver os pontos 11 a 13). É necessário justificar as concentrações escolhidas em cada caso.

5. Os animais moribundos ou que apresentem sinais óbvios de dor ou de grande sofrimento continuado devem ser eutanasiados. Os animais moribundos são equiparados aos que morrem durante o ensaio. O documento de orientações da OCDE relativo aos parâmetros eticamente mensuráveis (3) define os critérios que devem presidir à decisão de eutanasiar animais moribundos ou em grande sofrimento, bem como orientações sobre o reconhecimento da morte previsível ou iminente.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Escolha da espécie animal

6. Devem ser utilizados roedores adultos, jovens e saudáveis de estirpes laboratoriais de uso corrente. A espécie preferida é o rato. É necessário justificar o recurso a outras espécies.

Preparação dos animais

7. As fêmeas utilizadas devem ser nulíparas e não podem estar grávidas. No dia da seleção aleatória, os animais devem ser adultos jovens com sete a nove semanas, de peso corporal não desviado mais de 20 % do peso médio correspondente a cada sexo. Os animais são selecionados aleatoriamente, marcados para identificação individual e mantidos nas suas gaiolas durante, pelo menos, cinco dias antes do início do ensaio, para aclimatação às condições laboratoriais.

Manutenção dos animais

8. É necessário identificar individualmente cada animal, se possível com um respondedor (*transponder*) subcutâneo, para facilitar as observações e evitar confusões. A temperatura do biotério deve ser de 22 °C ± 3 °C. O ideal será manter a humidade relativa entre 30 % e 70 %, embora isto possa não ser possível ao utilizar água como veículo. Antes e depois das exposições, os animais são geralmente engaiolados por sexo e por concentração, mas o número de animais por gaiola não deve dificultar a clara observação de cada animal e deve minimizar as perdas devidas a lutas ou canibalismo. Quando se opta pela exposição unicamente nasal dos animais, pode ser necessário aclimatá-los aos tubos de contenção. Estes não devem provocar aos animais tensões físicas, térmicas ou dinâmicas excessivas. A contenção dos animais pode afetar parâmetros fisiológicos como a temperatura corporal (hipertermia) e/ou o volume respirado por minuto. Caso se disponha de dados genéricos reveladores de que nenhuma destas alterações ocorre em grau apreciável, não será necessária a adaptação prévia aos tubos de contenção. Os animais cujo corpo seja exposto na totalidade a um aerossol devem permanecer em gaiolas individuais durante a exposição, para evitar que o aerossol seja filtrado pela pelagem dos que com eles coabitem. Exceto nos períodos de exposição, podem utilizar-se dietas convencionais certificadas de laboratório, com fornecimento ilimitado de água potável da rede pública. A iluminação deve ser artificial, com uma sequência de 12 horas de luz seguidas de 12 horas de escuridão.

▼M4

Câmaras de inalação

9. Ao escolher-se a câmara de inalação, deve ter-se em conta a natureza do produto químico em estudo e o objetivo do ensaio. Privilegia-se o modo de exposição unicamente nasal, termo que abrange as exposições "unicamente da cabeça", "unicamente do nariz" e "unicamente do focinho". A exposição unicamente nasal é geralmente preferida no estudo de aerossóis de líquidos ou de sólidos, ou de vapores que possam condensar-se e formar aerossóis. Para determinados objetivos do estudo, poderá ser melhor recorrer ao modo de exposição de corpo inteiro, mas será necessário justificá-lo no relatório. Para garantir estabilidade atmosférica nas câmaras de corpo inteiro, o volume de todos os animais presentes em cada câmara não deve exceder 5 % do volume da câmara. O documento GD 39 (2) descreve os princípios, vantagens e desvantagens das técnicas de exposição unicamente nasal e de corpo inteiro.

ESTUDOS DA TOXICIDADE

Concentrações-limite

10. Contrariamente aos estudos de toxicidade aguda, nos estudos de toxicidade subaguda por inalação a 28 dias não está definida nenhuma concentração--limite. Na escolha da concentração máxima a ensaiar, deve ter-se em conta a concentração máxima atingível, o nível de exposição humana mais desfavorável, a necessidade de manter um fornecimento adequado de oxigénio e/ou considerações de bem-estar animal. Se os dados disponíveis não permitirem estabelecer limites, podem utilizar-se os valores-limite de exposição aguda fixados no Regulamento (CE) n.º 1272/2008 (13) – concentração máxima até 5 mg/l para aerossóis, 20 mg/l para vapores e 20 000 ppm para gases; ver igualmente o GD 39 (2). Se for necessário exceder estes limites ao ensaiar gases ou produtos químicos muito voláteis (por exemplo, refrigerantes), haverá que justificá-lo. A concentração-limite deve induzir efeitos tóxicos inequívocos sem gerar tensões desnecessárias nos animais nem afetar a longevidade dos mesmos (3).

Estudo exploratório

11. Antes de iniciar o estudo principal, pode ser necessário realizar um estudo exploratório. Um estudo exploratório com as características aqui definidas é mais completo do que um estudo preliminar, por não se limitar à escolha das concentrações. O êxito do estudo principal pode depender dos conhecimentos adquiridos num estudo exploratório. Este pode, por exemplo, fornecer informações técnicas sobre métodos de análise, granulometria, mecanismos de toxicidade, dados histopatológicos e de patologia clínica e estimativas do nível sem observação de efeitos adversos (NOAEL) e da concentração máxima tolerada no estudo principal. Fica ao critério do diretor do estudo recorrer a um estudo exploratório para determinar o limite mínimo de irritação do aparelho respiratório (por exemplo, por meio de uma histopatologia do aparelho respiratório, de testes da função pulmonar ou de uma lavagem broncoalveolar), a concentração máxima que os animais toleram sem tensões excessivas e os parâmetros que melhor caracterizam a toxicidade do produto químico em estudo.

12. O estudo exploratório pode abranger uma ou mais concentrações. A cada concentração, expõem-se, no máximo, três machos e três fêmeas. A duração deste estudo varia entrecinco dias, no mínimo, e geralmente não mais de 14 dias. É necessário justificar no relatório as concentrações escolhidas para o estudo principal. O objetivo deste último é demonstrar a existência de uma relação entre a concentração e a resposta obtida para o parâmetro previsivelmente mais sensível. Idealmente, a concentração mais baixa deve ser a concentração sem efeitos adversos observáveis e a concentração mais alta deve induzir efeitos tóxicos inequívocos, sem gerar tensões desnecessárias nos animais nem afetar a longevidade dos mesmos (3).

▼M4

13. Ao escolher os níveis de concentração para o estudo exploratório, devem ponderar-se todas as informações disponíveis, incluindo relações estrutura-atividade e dados relativos a produtos químicos semelhantes (ver o ponto 3). O estudo exploratório pode confirmar ou refutar a escolha dos parâmetros mais sensíveis segundo critérios mecanísticos, por exemplo, a inibição da colinesterase por organofosfatos, a formação de meta-hemoglobina por agentes eritrocitotóxicos, as hormonas tiroideias (T_3 e T_4), no caso dos agentes tirotóxicos, proteínas, a LDH, ou a presença de neutrófilos na lavagem broncoalveolar, no caso de partículas inócuas fracamente solúveis ou de aerossóis irritantes dos pulmões.

Estudo principal

14. Um estudo principal de toxicidade subaguda compreende geralmente três níveis de concentração, bem como, em paralelo, os controlos negativo (do ar) e/ou do veículo (ver o ponto 17). Para facilitar a seleção dos níveis de exposição, devem ser utilizados todos os dados disponíveis, nomeadamente resultados de estudos de toxicidade sistémica, metabólicos e cinéticos (deve ter-se especial cuidado em evitar níveis de concentração elevados que saturem os processos cinéticos). Cada grupo de ensaio compreende, pelo menos, a exposição de dez roedores (cinco machos e cinco fêmeas) ao produto químico em estudo, durante seis horas por dia e cinco dias por semana, ao longo de quatro semanas (a duração total do estudo é de 28 dias). Os animais também podem ser expostos sete dias por semana (por exemplo, ao ensaiar produtos farmacêuticos inalados). Se um dos sexos for reconhecidamente mais sensível ao produto químico em estudo, pode expor-se cada sexo a concentrações diferentes das utilizadas para o outro, a fim de otimizar a resposta à concentração como se refere no ponto 15. Se espécies que não o rato forem sujeitas a exposição unicamente nasal, pode ajustar-se a duração máxima da exposição para minimizar a tensão gerada na espécie em causa. Se a duração da exposição for inferior a seis horas por dia ou se for necessário realizar um estudo de exposição de longa duração (por exemplo, 22 horas por dia) de corpo inteiro [ver o GD 39 (2)], será necessário justificá-lo. Durante o período de exposição, a alimentação deve ser suspensa, exceto se a exposição exceder seis horas. Durante as exposições de corpo inteiro pode continuar a fornecer-se água.

15. As concentrações visadas escolhidas devem permitir identificar o(s) órgão(s)-alvo e evidenciar uma relação clara entre a concentração e a resposta obtida:

— o nível de concentração mais elevado deve gerar efeitos tóxicos, mas não causar sintomas deletérios nem mortalidade, que impediriam a interpretação dos resultados,

— o espaçamento do nível ou níveis de concentração intermédios deve permitir uma gradação dos efeitos tóxicos entre os correspondentes aos das concentrações mais baixa e mais elevada,

— o nível de concentração mais baixo não deve ter efeitos tóxicos ou, se os tiver, estes devem ser reduzidos.

Estudo em grupos satélites (para apreciação da reversibilidade)

16. Pode recorrer-se a um estudo satélite para observar a reversibilidade, a persistência ou o aparecimento diferido de efeitos tóxicos durante um período adequado, não inferior a 14 dias, após o termo da exposição. Compõem os grupos satélites cinco machos e cinco fêmeas, que são expostos ao mesmo tempo que os animais ensaiados no estudo principal. Os animais dos grupos satélites são expostos à concentração mais elevada do produto químico em estudo e devem ser complementados pelos grupos necessários de controlo do ar e/ou do veículo em paralelo (ver o ponto 17).

▼M4

Animais de controlo

17. Os animais de controlo negativo (do ar) em paralelo devem ser tratados do mesmo modo que os animais dos grupos que participam no ensaio principal, exceto que são expostos a ar filtrado em vez de ao produto químico em estudo. Se for utilizada água ou outra substância para gerar a atmosfera ensaiada, deve incluir-se no estudo, em vez do grupo de controlo negativo (do ar), um grupo de controlo do veículo. Sempre que possível, o veículo utilizado deve ser água. Se assim for, os animais de controlo são expostos a ar com a mesma humidade relativa que o ar utilizado para os grupos expostos ao produto químico em estudo. A escolha do veículo mais adequado deve basear-se em dados históricos ou num estudo prévio convenientemente realizado. Se não se conhecer bem a toxicidade do veículo, fica ao critério do diretor do estudo utilizar em simultâneo um controlo negativo (do ar) e um controlo do veículo, embora se desaconselhe fortemente este procedimento. Se os dados históricos revelarem que o veículo não é tóxico, não haverá necessidade de um grupo de controlo negativo (do ar) e apenas deve utilizar-se um controlo do veículo. Se um estudo prévio de um produto químico incorporado num determinado veículo não revelar toxicidade, conclui-se que o veículo em causa não é tóxico à concentração ensaiada, devendo utilizar-se esse controlo do veículo.

CONDIÇÕES DE EXPOSIÇÃO

Administração das concentrações

18. Os animais são expostos ao produto químico em estudo sob a forma de gás, vapor, aerossol ou de uma mistura destes. O estado físico a ensaiar depende das propriedades físico-químicas do produto químico em estudo, da concentração escolhida e/ou da forma física cuja probabilidade de presença durante a manipulação e utilização do mesmo seja maior. Os produtos químicos higroscópicos ou quimicamente reativos devem ser ensaiados em atmosfera seca. Devem tomar-se precauções para evitar concentrações que possam provocar explosões. As matérias em partículas podem ser sujeitas a processos mecânicos para reduzir a granulometria. Para mais orientações, consultar o documento GD 39 (2).

Distribuição granulométrica

19. Os aerossóis e os vapores que possam condensar-se em aerossóis devem ser objeto de análise granulométrica. Para que todas as zonas pertinentes do aparelho respiratório sejam expostas, recomenda-se a utilização de aerossóis com diâmetro aerodinâmico mediano da massa (MMAD) compreendido entre 1 μm e 3 μm e desvio-padrão geométrico (σ_g) compreendido entre 1,5 e 3,0 (4). Deve fazer-se o razoavelmente possível para respeitar estas condições, sendo necessário um parecer especializado caso isso não se consiga. Por exemplo, as partículas dos fumos metálicos podem ser mais pequenas do que o limite inferior indicado, ao passo que as partículas carregadas e as fibras podem exceder o limite superior.

Incorporação do produto químico em estudo num veículo

20. Idealmente, o produto químico em estudo deve ser ensaiado sem que tenha sido incorporado num veículo. Se for necessário utilizar um veículo para obter a concentração e a granulometria adequadas do produto químico em causa, deve preferir-se a água. Se o produto químico for dissolvido num veículo, será necessário comprovar que se mantém estável.

MONITORIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXPOSIÇÃO

Caudal de ar nas câmaras

21. Durante cada exposição, é necessário regular cuidadosamente, monitorizar continuamente e registar pelo menos de hora a hora o caudal de ar através de cada câmara. A monitorização em tempo real da concentração (ou estabilidade no tempo) da atmosfera em estudo constitui uma medida permanente de todos os parâmetros dinâmicos e um meio indireto de regular

▼M4

os que têm importância para a inalação. Se a concentração for monitorizada em tempo real, pode reduzir-se a frequência da medição do caudal de ar a apenas uma medição diária por exposição. É necessário ter especial cuidado em evitar reinalações nas câmaras de exposição unicamente nasal. A concentração de oxigénio não deve ser inferior a 19 % e a concentração de dióxido de carbono não deve exceder 1 %. Se houver razões para crer que estas concentrações não são respeitadas, é necessário medi-las. Se as medições efetuadas no primeiro dia de exposição mostrarem que as concentrações destes gases estão aos níveis corretos, não é necessário voltar a medi-las.

Temperatura e humidade relativa nas câmaras

22. Deve manter-se a temperatura nas câmaras a 22 °C ± 3 °C. Tanto no caso das exposições unicamente nasais como das exposições do corpo inteiro, é necessário monitorizar continuamente a humidade relativa na zona de respiração dos animais e, se possível, registá-la de hora a hora durante cada exposição. É preferível manter a humidade relativa entre 30 % e 70 %, mas isso pode não ser possível (por exemplo, quando se estudam misturas aquosas) ou pode não ser mensurável (devido a interferências do produto químico em estudo com o método de ensaio).

Concentração nominal do produto químico em estudo

23. Sempre que possível, deve calcular-se e registar-se a concentração nominal na câmara de exposição. Esta é dada pela divisão da massa gerada do produto químico em estudo pelo volume de ar total que circulou pelo sistema da câmara de inalação. A concentração nominal não é utilizada para caracterizar a exposição dos animais, mas a sua comparação com a concentração real dá uma indicação da eficácia de geração do sistema de ensaio, podendo ser utilizada para detetar problemas a esse nível.

Concentração real do produto químico em estudo

24. Entende-se por "concentração real do produto químico em estudo", a concentração do produto químico nas amostras colhidas na zona de respiração dos animais da câmara de inalação. As concentrações reais podem determinar-se por métodos específicos (por exemplo, amostragem direta ou métodos de adsorção ou de reação química e posterior caracterização analítica) ou por métodos inespecíficos, tais como gravimetria após filtração. O método gravimétrico só é aceitável para aerossóis de pós com um único componente ou de líquidos pouco voláteis e deve apoiar-se em caracterizações adequadas específicas do produto químico em causa efetuadas antes da realização do estudo. A concentração de aerossóis de pós com vários componentes também pode determinar-se por gravimetria. Todavia, são necessários para isso dados analíticos que demonstrem que a composição do produto transportado no aerossol é semelhante à do produto inicial. Se não se dispuser desses dados, pode ser necessário reanalisar periodicamente o produto químico em estudo (idealmente no aerossol) durante o ensaio. No caso dos agentes aerossolizados que possam evaporar-se ou sublimar, é necessário demonstrar que todas as fases são recolhidas pelo método escolhido.

25. Deve utilizar-se, se possível, apenas um lote do produto químico em estudo durante os ensaios e a amostra em estudo deve ser conservada em condições que preservem a sua pureza, homogeneidade e estabilidade. Antes de iniciar o estudo, deve caracterizar-se o produto químico em causa no que respeita à sua pureza e, se tecnicamente viável, à sua identidade e às quantidades dos contaminantes e impurezas nele identificados. Para o efeito, pode recorrer-se, entre outros, aos seguintes dados: tempos de retenção e áreas relativas de picos, pesos moleculares obtidos por espetrometria de massa ou cromatografia em fase gasosa ou outras estimativas. Embora a identidade da amostra a estudar não seja da responsabilidade do laboratório, pode ser aconselhável que este confirme, pelo menos, alguns aspetos da caracterização efetuada pelo cliente (cor, natureza física, etc.).

▼M4

26. Deve manter-se a atmosfera de exposição tão constante quanto possível. Para demonstrar a estabilidade das condições de exposição, pode utilizar-se um dispositivo de monitorização em tempo real, tal como um fotómetro de aerossóis, para esses casos, ou, para vapores, um analisador de hidrocarbonetos totais. Deve medir-se a concentração real na câmara pelo menos três vezes por nível de exposição, em cada dia de exposição. Se isso não for viável, por limitações relacionadas com o caudal de ar ou devido a concentrações baixas, aceita-se uma amostra por período de exposição. Idealmente, essa amostra deve então ser colhida ao longo de todo o período de exposição. A concentração na câmara correspondente a uma determinada amostra não deve desviar-se da concentração média na câmara mais de 10 %, no caso de gases e vapores, nem mais de 20 %, no caso de aerossóis de líquidos ou de sólidos. Deve calcular-se e indicar-se no relatório o tempo necessário para a câmara atingir o equilíbrio (t_{95}). A duração da exposição corresponde ao tempo de geração do produto químico em estudo, incluído o tempo necessário para a câmara atingir o equilíbrio (t_{95}) e para o decaimento da concentração. O documento GD 39 (2) contém orientações para a estimativa do t_{95}.

27. No caso de misturas muito complexas de gases ou vapores e de aerossóis (por exemplo, atmosferas de combustão e produtos químicos gerados por produtos ou dispositivos finais específicos), o comportamento de cada fase na câmara de inalação pode ser diferente. Por esse motivo, deve escolher-se em cada fase (gás ou vapor e aerossol) pelo menos uma substância indicadora (substância analisada), normalmente a principal substância ativa da mistura. Se o produto químico em estudo for uma mistura, deve indicar-se no relatório a concentração analítica correspondente à mistura e não apenas a concentração correspondente ao ingrediente ativo ou à substância indicadora (substância analisada) em causa. O documento GD 39 (2) contém mais informações sobre as concentrações reais.

Distribuição granulométrica do produto químico em estudo

28. Deve determinar-se a distribuição granulométrica dos aerossóis pelo menos semanalmente por nível de concentração, recorrendo a um impactor de cascata ou a outro instrumento, tal como um granulómetro aerodinâmico. Se for possível demonstrar a equivalência dos resultados obtidos pelo impactor de cascata e pelo instrumento alternativo, pode utilizar-se este último em todo o estudo.

29. Em paralelo ao instrumento primário, deve utilizar-se um segundo dispositivo, tal como um filtro gravimétrico ou um borbulhador de gás/impactor *impinger*, para confirmar a eficiência de captação do primeiro. As concentrações mássicas obtidas por análise granulométrica e por análise com filtros não devem diferir entre si mais do que valores razoáveis [ver o GD 39 (2)]. Se for possível demonstrar esta equivalência, a todas as concentrações ensaiadas, no início do estudo, não é necessário efetuar mais medições de confirmação. Por razões de bem-estar animal, devem tomar-se medidas para minimizar dados inconclusivos que possam obrigar à repetição do estudo.

30. É necessário efetuar uma análise granulométrica no caso dos vapores que possam condensar-se para formar aerossóis ou se forem detetadas partículas numa atmosfera de vapores suscetível de formar fases mistas.

EXAMES

31. Os animais devem ser examinados clinicamente antes, durante e depois do período de exposição. Consoante a resposta dos animais durante a exposição, pode ser conveniente aumentar a frequência dos exames. Se for difícil examinar os animais devido aos tubos de contenção utilizados, à reduzida iluminação das câmaras de corpo inteiro ou à opacidade da atmosfera, deve-se examiná-los cuidadosamente depois da exposição. Os exames realizados antes da exposição do dia seguinte podem apreciar a eventual reversibilidade ou intensificação dos efeitos tóxicos.

▼**M4**

32. Todos os exames devem ser registados, mantendo registos individuais para cada animal. Se forem eutanasiados animais ou forem encontrados animais mortos, deve registar-se o momento da morte com a maior exatidão possível.

33. Os exames a efetuar aos animais engaiolados devem incidir, nomeadamente, nas alterações da pele e da pelagem, dos olhos e das mucosas, do aparelho respiratório, do sistema circulatório, do sistema nervoso, da atividade somatomotora e do comportamento. Deve estar-se atento a tremores, convulsões, salivação, diarreia, letargia, sono e coma. A medição da temperatura retal pode corroborar uma bradipneia reflexa ou uma hipo/hipertermia relacionadas com a exposição ou com o confinamento. Entre as avaliações suplementares que podem incluir-se no protocolo de estudo contam-se as de parâmetros cinéticos ou ao nível da biomonitorização, da função pulmonar, da retenção de matérias fracamente solúveis acumuladas no tecido pulmonar e de alterações comportamentais.

PESO CORPORAL

34. Regista-se o peso de cada animal pouco antes da primeira exposição (dia 0) e, em seguida, duas vezes por semana (por exemplo, às sextas-feiras e às segundas-feiras, para verificar a recuperação durante o fim de semana sem exposição, ou intervaladas de modo a possibilitar a avaliação da toxicidade sistémica), bem como no momento da morte ou da eutanásia. Se não se registarem efeitos nas duas primeiras semanas, durante o resto do estudo podem medir-se os pesos corporais apenas uma vez por semana. Os animais que integram os (eventuais) grupos satélites (para apreciação da reversibilidade) devem continuar a ser pesados semanalmente durante o período de recuperação. No termo do estudo, pesa-se cada animal pouco antes de ser eutanasiado, para não falsear o cálculo da relação entre o peso de cada órgão e o peso corporal.

CONSUMO DE ALIMENTOS E DE ÁGUA

35. Mede-se semanalmente o consumo de alimentos, podendo também medir-se o consumo de água.

PATOLOGIA CLÍNICA

36. Efetua-se uma avaliação de patologia clínica a todos os animais depois de eutanasiados, incluindo os dos grupos de controlo e dos grupos satélites (para apreciação da reversibilidade). Regista-se o lapso de tempo entre o termo da exposição e a colheita de sangue, em especial quando a reconstituição do parâmetro visado é rápida. Recomenda-se que, após o termo da exposição, sejam colhidas amostras para análise dos parâmetros com tempo de meia-vida plasmático curto – por exemplo, a carboxi-hemoglobina (COHb), a colinesterase (CHE), e a meta-hemoglobina (MetHb).

37. São enumerados no quadro 1 os parâmetros de patologia clínica normalmente exigidos nos estudos toxicológicos. A análise da urina não é exigida por rotina, mas pode efetuar-se quando a toxicidade prevista ou observada o aconselharem. Fica ao critério do diretor do estudo decidir avaliar outros parâmetros, para melhor caracterização da toxicidade do produto químico (por exemplo, colinesterase, lípidos, hormonas, equilíbrio ácido-base, meta-hemoglobina ou corpos de Heinz, creatinina-cinase, relação mieloide/ /eritroide, troponinas, gases no sangue arterial, lactato-desidrogenase, sorbitol-desidrogenase, glutamato-desidrogenase e gama-glutamil-transpeptidase).

▼M4

Quadro 1

Parâmetros clássicos de patologia clínica

Hematologia	
Contagem de eritrócitos	Contagem total de leucócitos
Hematócrito	Fórmula leucocitária
Concentração de hemoglobina	Contagem de plaquetas
Hemoglobina corpuscular média	Potencial de coagulação (escolher um):
Volume corpuscular médio	— tempo de protrombina
Concentração de hemoglobina corpuscular média	— tempo de coagulação
Reticulócitos	— tempo de tromboplastina parcial
Química clínica	
Glucose (*)	Alanina-aminotransferase
Colesterol total	Aspartato-aminotransferase
Triglicéridos	Fosfatase alcalina
Azoto ureico no sangue	Potássio
Bilirrubina total	Sódio
Creatinina	Cálcio
Proteínas totais	Fósforo
Albumina	Cloretos
Globulina	
fAnálise da urina (facultativa)	
Aspeto (cor e turvação)	Proteínas totais
Volume	Glucose
Densidade ou osmolalidade	Sangue/células sanguíneas
pH	

(*) Dado que um período longo de jejum pode distorcer as determinações da glucose dos animais expostos relativamente aos animais dos grupos de controlo, fica ao critério do diretor do estudo fazer ou não os animais jejuar. Se a opção for por um período de jejum, este deve ser adaptado à espécie – no caso do rato, pode ser de 16 horas (jejum noturno). Pode determinar-se a glucose em jejum após jejum noturno durante a última semana de exposição ou após jejum noturno antes da autópsia (neste caso, juntamente com todos os outros parâmetros de patologia clínica).

38. Se houver indícios de que a zona principal de deposição e retenção são as vias respiratórias inferiores (isto é, os alvéolos), a lavagem broncoalveolar pode ser a técnica mais adequada para efetuar uma análise quantitativa de parâmetros que hipoteticamente permitam avaliar a relação entre a dose e os efeitos por esta induzidos, com especial incidência para alveolites, inflamações pulmonares e fosfolipidose. Este processo permite estudar convenientemente os efeitos nos alvéolos das doses aplicadas e a evolução das lesões alveolares daí resultantes. Podem determinar-se no fluido da lavagem broncoalveolar a contagem total de leucócitos, a fórmula leucocitária, as proteínas totais e a lactato-desidrogenase. Outros parâmetros eventualmente a ponderar são os indicativos de alterações lisossómicas, fosfolipidose e fibrose, bem como de irritações e reações inflamatórias alérgicas, que podem compreender a determinação de citocinas ou quimiocinas pró-inflamatórias. As determinações no fluido proveniente da lavagem broncoalveolar complementam muitas vezes os exames histopatológicos, mas não os substituem. O documento GD 39 (2) contém orientações sobre a realização da lavagem pulmonar.

▼M4

MACROPATOLOGIA E PESO DO ÓRGÃOS

39. Os animais utilizados nos ensaios (incluindo os que morrerem durante o ensaio ou que forem eutanasiados e retirados do estudo por razões de bem-estar animal) devem ser completamente sangrados (se possível) e sujeitos a uma autópsia macroscópica. Deve registar-se o lapso de tempo entre o termo da última exposição de cada animal e o momento em que o animal é eutanasiado. Se não for possível realizar a autópsia imediatamente depois de detetada a morte do animal, este deve ser refrigerado (não congelado) a uma temperatura suficientemente baixa para minimizar a autólise. As autópsias devem ser efetuadas o mais rapidamente possível, normalmente não mais de um ou dois dias após a morte. Registam-se todas as alterações patológicas macroscópicas de cada animal, prestando especial atenção às alterações do aparelho respiratório.

40. Enumeram-se no quadro 2 os órgãos e tecidos a conservar num meio adequado, durante a autópsia macroscópica, para os exames histopatológicos. A preservação dos órgãos e tecidos indicados entre parênteses retos e de quaisquer outros não indicados fica ao critério do diretor do estudo. Os órgãos **indicados** a negrito devem ser separados dos tecidos aderentes e pesados ainda húmidos o mais rapidamente possível depois da dissecação, para evitar que sequem. A tiroide e os epidídimos só devem pesar-se se for necessário, porque os instrumentos utilizados para separar os tecidos aderentes podem comprometer a avaliação histopatológica. Logo depois da autópsia, fixam-se os tecidos e órgãos em formalina a 10 % tamponada ou com outro fixador adequado. A remoção dos tecidos aderentes só deve realizar-se 24 a 48 horas depois, consoante o fixador utilizado.

Quadro 2

Órgãos e tecidos a conservar durante a autópsia macroscópica

Glândulas suprarrenais	Vesículas seminais
Medula óssea (e/ou uma punção recente)	Medula espinal (cervical, mediotorácica e lombar)
Encéfalo (incluindo secções dos hemisférios cerebrais, do cerebelo e da medula/protuberância anelar)	**Baço**
[Olhos (retina, nervo ótico) e pálpebras]	Estômago
Coração	**Testículos**
Rins	**Timo**
Laringe (secção em três níveis, um dos quais compreendendo a base da epiglote)	Tiroide
Fígado	Traqueia (secção pelo menos em dois níveis, incluindo uma secção longitudinal na carina e uma secção transversal)
Pulmões (secção de cada lobo a um só nível, incluindo os brônquios principais)	[Bexiga urinária]
Gânglios linfáticos da região hilar dos pulmões, especialmente no caso de produtos químicos pouco solúveis que se apresentem sob a forma de partículas. Para exames e/ou estudos mais aprofundados de cariz imunológico, podem conservar-se outros gânglios linfáticos, nomeadamente os das regiões mediastinal, cervical/submandibular e/ou auricular.	Útero
	Todas as lesões macroscópicas
Tecidos nasofaríngeos (secção pelo menos em quatro níveis, um dos quais compreendendo o canal nasofaríngeo e os tecidos linfáticos associados à mucosa nasal — *"nasal associated lymphoid tissue",* NALT).	
Esófago	
[Bolbo olfativo]	
Ovários	

▼M4

41. Os pulmões são removidos intactos, pesados e instila-se-lhes um fixador adequado, à pressão de 20 a 30 cm de coluna de água, para conservar a estrutura pulmonar (5). Secciona-se cada lobo a um só nível (incluindo os brônquios principais); caso se proceda a lavagem pulmonar, secciona-se o lobo não lavado em três níveis (não sequenciais).

42. São examinados pelo menos quatro níveis dos tecidos nasofaríngeos, um dos quais deve compreender o canal nasofaríngeo (5)(6)(7)(8)(9), para possibilitar um exame adequado do epitélio escamoso, de transição (respiratório não ciliado), respiratório (respiratório ciliado) e olfativo, assim como o tecido linfático adjacente — NALT (10)(11). São examinados e três níveis da laringe, um dos quais deve incluir a base da epiglote (12). São examinados pelo menos dois níveis da traqueia, incluindo uma secção longitudinal na carina da bifurcação que dá origem aos brônquios extrapulmonares e uma secção transversal.

HISTOPATOLOGIA

43. Deve efetuar-se uma avaliação histopatológica dos órgãos e tecidos indicados no quadro 2 a cada animal do grupo com a concentração mais elevada e dos grupos de controlo, bem como aos animais que morrerem ou forem eutanasiados durante o estudo. Deve prestar-se especial atenção ao aparelho respiratório, aos órgãos-alvo e às lesões macroscópicas. Os órgãos e tecidos que apresentem lesões nos animais do grupo com a concentração mais elevada devem ser examinados em todos os grupos. Fica ao critério do diretor do estudo efetuar avaliações histopatológicas a outros grupos, para evidenciar uma resposta clara à concentração. Caso se tenha constituído um grupo satélite de animais (para apreciação da reversibilidade), deve efetuar-se o exame histopatológico dos tecidos e órgãos que tenham revelado alterações nos animais dos outros grupos expostos. Se o número de mortes prematuras ou outros problemas no grupo com a concentração mais elevada for excessivo, a ponto de comprometer a significância dos dados, efetua-se um exame histopatológico dos animais expostos ao nível de concentração imediatamente inferior. Deve procurar-se estabelecer correlações entre as observações macroscópicas e os resultados dos exames microscópicos.

DADOS E RELATÓRIOS

Dados

44. Devem ser apresentados dados por animal relativos a peso corporal, consumo alimentar, patologias clínicas, macropatologias, peso dos órgãos e histopatologias. Devem ser resumidos os resultados dos exames clínicos num quadro, indicando, para cada grupo estudado, o número de animais utilizados, o número de animais que apresentaram sinais específicos de toxicidade, o número de animais que morreram durante o ensaio ou que foram eutanasiados e o momento da morte de cada animal, complementados por uma descrição dos efeitos tóxicos e da evolução e reversibilidade destes, bem como pelos resultados das autópsias. Os resultados, quantitativos ou outros, devem ser avaliados por um método estatístico adequado. Os métodos estatísticos devem ser escolhidos no planeamento do estudo, podendo sê-lo qualquer método estatístico corrente adequado.

Relatório dos ensaios

45. Elementos a constar, quando pertinente, do relatório dos ensaios:

Animais estudados e condições em que são mantidos

— descrição das condições de engaiolamento, nomeadamente: número (ou alteração do número) de animais por gaiola, camas, temperatura e humidade relativa ambientes, fotoperíodo e dieta,

▼M4

— espécie e estirpe utilizadas e, caso não sejam utilizados ratos, justificação da utilização de outra espécie. Podem apresentar-se dados originários da proveniência dos animais ou dados históricos, desde que correspondentes a animais sujeitos às mesmas condições de exposição, alojamento e jejum,

— número, idade e sexo,

— método de aleatorização,

— descrição de eventuais condicionamentos anteriores ao ensaio, nomeadamente ao nível da dieta, de quarentenas e do tratamento de doenças.

Produto químico em estudo

— natureza física, grau de pureza e propriedades físico-químicas pertinentes (incluindo a isomerização),

— dados de identificação e, se for conhecido, número de registo CAS (*Chemical Abstract Service*).

Veículo

— justificação da utilização e da escolha do veículo (se não for água),

— dados históricos ou paralelos demonstrativos de que o veículo não interfere nos resultados do estudo.

Câmaras de inalação

— descrição pormenorizada – incluindo o volume e um esquema – das câmaras de inalação,

— origem e descrição do equipamento utilizado na exposição dos animais e na geração da atmosfera,

— equipamento de medição da temperatura, humidade, granulometria e concentração real,

— fonte de ar e sistema de climatização utilizado,

— métodos utilizados para calibrar o equipamento a fim de garantir a homogeneidade da atmosfera ensaiada,

— subpressão ou sobrepressão,

— pontos de exposição por câmara (de exposição unicamente nasal); localização dos animais na câmara (câmara de exposição de corpo inteiro),

— estabilidade da atmosfera utilizada nos ensaios,

— localização nas câmaras dos sensores térmicos e higrométricos e dos pontos de colheita de amostras da atmosfera ensaiada,

— tratamento do ar fornecido/evacuado,

— caudais de ar, caudal de ar em cada ponto de exposição (exposição unicamente nasal) ou relação entre o volume ocupado pelos animais e o volume da câmara (câmara de exposição de corpo inteiro),

— tempo necessário para as câmaras de inalação atingirem o equilíbrio (t95),

— número horário de substituições de volume,

— medidores (se existirem).

Elementos relativos à exposição

— fundamentação da escolha da concentração visada no estudo principal,

▼M4

— concentrações nominais (dadas pela divisão da massa do produto químico em estudo introduzido na câmara de inalação pelo volume de ar total que nela circulou),

— concentrações reais do produto químico em estudo obtidas na zona de respiração dos animais; no caso das misturas que geram formas físicas heterogéneas (gases, vapores, aerossóis), pode analisar-se separadamente cada uma delas,

— as concentrações no ar devem indicar-se em unidades de massa (mg/l, mg/m^3, etc.) e não de volume (ppm, ppb, etc.),

— distribuição granulométrica, diâmetro aerodinâmico mediano da massa (MMAD) e desvio-padrão geométrico (σ_g), incluindo os métodos de cálculo correspondentes; indicar também o resultado de cada análise granulométrica efetuada.

Condições de realização dos ensaios

— elementos sobre a preparação do produto químico estudado, nomeadamente sobre eventuais métodos de redução da granulometria de sólidos ou de preparação de soluções do produto químico,

— descrição (de preferência complementada por um esquema) do equipamento utilizado para gerar a atmosfera dos ensaios e para expor os animais a essa atmosfera,

— elementos relativos ao equipamento de monitorização da temperatura, humidade e caudal de ar nas câmaras (curvas de calibração),

— elementos relativos ao equipamento utilizado para colher as amostras para determinação da granulometria e da concentração nas câmaras,

— elementos sobre o método de análise química utilizado e sobre a validação desse método (incluindo o rendimento da recuperação do produto químico em estudo do meio amostrado),

— método utilizado para distribuir aleatoriamente os animais pelos grupos ensaiados e pelos grupos de controlo,

— elementos sobre a qualidade dos alimentos e da água (incluindo o tipo de dieta e a origem desta, bem como a origem da água),

— fundamentação da escolha das concentrações utilizadas nos ensaios.

Resultados

— quadro com a temperatura, a humidade e o caudal de ar nas câmaras,

— quadro com as concentrações nominais e reais nas câmaras,

— quadro com os dados granulométricos, nomeadamente dados analíticos sobre a colheita de amostras, a distribuição granulométrica e os cálculos de MMAD e σ_g,

— uadro com os dados de resposta e as concentrações correspondentes a cada animal (animais que apresentaram sinais de toxicidade, incluindo mortalidade, e natureza, intensidade, momento do aparecimento e duração dos efeitos),

▼M4

— quadro com os pesos de cada animal,

— quadro dos consumos alimentares,

— quadro dos dados de patologia clínica,

— resultados da autópsia e resultados histopatológicos correspondentes a cada animal, se disponíveis,

— quadros dos restantes parâmetros medidos.

Discussão e interpretação dos resultados

— deve ser dada especial atenção à descrição dos métodos utilizados para satisfazer os critérios deste método de ensaio, nomeadamente no que respeita à concentração-limite e à granulometria,

— examinar em que medida, com base nos resultados globais, as partículas são respiráveis, em especial se os critérios granulométricos não forem satisfeitos,

— a apreciação global do estudo deve incidir igualmente na coerência dos métodos utilizados para determinar as concentrações nominal e real e deve dar conta da relação entre estas concentrações,

— referir a causa provável da morte e o modo de ação predominante (sistémico ou local),

— explicar por que razão terá sido necessário eutanasiar animais que apresentavam sinais de dor ou de grande sofrimento continuado com base nos critérios do documento de orientações da OCDE relativo aos parâmetros eticamente mensuráveis (3),

— identificar o(s) órgão(s)-alvo,

— determinar o NOAEL e o LOAEL (nível mínimo com observação de efeitos adversos).

REFERÊNCIAS:

(1) OCDE (1981). Subchronic Inhalation Toxicity Testing, Original Test Guideline No 412. Environment Directorate, OCDE, Paris.

(2) OCDE (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39. ENV/JM/MONO(2009)28, OCDE, Paris.

(3) OCDE (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19. ENV/JM/MONO(2000)7, OCDE, Paris.

(4) Whalan J.E., Redden J.C. (1994). Interim Policy for Particle Size and Limit Concentration Issues in Inhalation Toxicity Studies. Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency.

(5) Dungworth D.L., Tyler W.S., Plopper C.E. (1985). Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology (Chapter 9) *in* Toxicology of Inhaled Material. Witschi, H.P. e Brain, J.D. (eds.). Springer Verlag Heidelberg, p. 229-258.

(6) Young J.T. (1981). Histopathological examination of the rat nasal cavity. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1:309-312.

(7) Harkema J.R. (1990). Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants. *Environ. Health Perspect.* 85:231-238.

▼**M4**

(8) Woutersen R.A., Garderen-Hoetmer A., van Slootweg P.J., Feron V.J. (1994). Upper respiratory tract carcinogenesis in experimental animals and in humans. *In* Waalkes M.P. e Ward J.M. (eds.) Carcinogenesis. Target Organ Toxicology Series. Raven Press, New York, 215-263.

(9) Mery S., Gross E.A., Joyner D.R., Godo M., Morgan K.T. (1994). Nasal diagrams: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice. *Toxicol. Pathol.* 22:353-372.

(10) Kuper C.F., Koornstra P.J., Hameleers D.M.H., Biewenga J., Spit B.J., Duijvestijn A.M., Breda Vriesman van P.J.C., Sminia T. (1992). The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. *Immunol. Today* 13:219-224.

(11) Kuper C.F., Arts J.H.E., Feron V.J. (2003). Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue. *Toxicol. Lett.* 140-141:281-285.

(12) Lewis D.J. (1981). Mitotic Indices of Rat Laryngeal Epithelia. *Journal of Anatomy* 132(3):419-428.

(13) Regulamento (CE) n.º 1272/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16 de dezembro de 2008, relativo à classificação, rotulagem e embalagem de substâncias e misturas, que altera e revoga as Diretivas 67/548/CEE e 1999/45/CE, e altera o Regulamento (CE) n.º 1907/2006 (JO L 353 de 31.12.2008, p. 1).

▼**M4**

Apêndice 1

DEFINIÇÃO

Produto químico em estudo: qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado este método de ensaio.

▼B

B.9. **TOXICIDADE (DÉRMICA) DA DOSE REPETIDA (28 DIAS)**

1. **MÉTODO**

1.1. INTRODUÇÃO

Ver Introdução Geral parte B (ponto A).

1.2. DEFINIÇÕES

Ver Introdução Geral, parte B (ponto B).

1.3. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

Nenhuma.

1.4. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

Administra-se à pele diariamente a substância de ensaio, em doses graduadas, a diversos grupos de animais de experiência, utilizando-se uma dose por grupo durante um período de 28 dias. Durante o período de administração observa-se os animais diariamente para se detectar manifestações de toxicidade. Faz-se a autópsia dos animais mortos durante o ensaio e no final do ensaio faz-se também a autópsia dos animais que sobreviveram ao teste.

1.5. CRITÉRIOS DE QUALIDADE

Nenhum.

1.6. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.6.1. **Preparativos**

Os animais são mantidos sob as condições de alojamento e alimentação experimentais durante pelo menos cinco dias antes do ensaio. Antes do ensaio procede-se a uma escolha aleatória de animais adultos, jovens e saudáveis e que são distribuídos por grupos de tratamento. Pouco tempo antes de se iniciar o ensaio rapa-se os pêlos da região dorsal dos animais. No caso de se recorrer à tosquia esta deverá ser efectuada aproximadamente 24 horas antes do ensaio. Normalmente é necessário repetir estas operações todas as semanas, devendo tomar-se muito cuidado para não lesar a pele. A área destinada à aplicação da substância de ensaio não poderá ser inferior a 10 % da superfície corporal. O peso do animal deverá ser tomado em consideração na decisão da zona a expor e da dimensão da superfície a tratar. Sempre que se procede ao ensaio de substâncias sólidas, as quais podem ser pulverizadas se necessário, a substância de ensaio deve ser humedecida com água ou com um veículo apropriado para garantir um bom contacto com a pele. As substâncias de ensaio líquidas são geralmente utilizadas sem serem diluídas. Procede-se a uma aplicação diária durante cinco a sete dias por semana.

1.6.2. **Condições da experiência**

1.6.2.1. *Animais de experiência*

Podem ser utilizados ratos adultos, coelhos ou cobaias. Outras espécies poderão ser utilizadas mas a sua utilização deverá ser justificada.

▼B

No início da experiência a diferença de peso entre os animais não poderá ultrapassar ± 20 % do peso médio apropriado.

1.6.2.2. *Número e sexo*

Para cada grupo de ensaio serão utilizados pelo menos 10 animais (cinco fêmeas e cinco machos) com pele saudável. As fêmeas deverão ser nulíparas e não grávidas. Se for previsível sacrificar alguns animais durante a experiência, deve acrescentar-se ao número inicial o número de animais que se prevê vir a sacrificar. Para além destes, poderá haver um grupo-satélite de 10 animais (cinco animais de cada sexo) tratado com a dose mais elevada durante 28 dias e observado quanto à reversibilidade, persistência ou aparecimento tardio de efeitos tóxicos durante 14 dias após o tratamento. Utiliza-se também um grupo-satélite de 10 animais de controlo (cinco animais de cada sexo).

1.6.2.3. *Doses*

São necessárias pelo menos três doses diferentes com um controlo ou com um veículo de controlo no caso de ser utilizado um veículo. O período de exposição deverá ser no mínimo de seis horas por dia. A substância de ensaio será aplicada diariamente à mesma hora e a quantidade a administrar será ajustada regularmente (semanal ou bissemanalmente) de modo a manter-se constante relativamente ao peso corporal do animal. Os animais do grupo de controlo serão tratados da mesma maneira que os animais dos grupos de experiência, com excepção da aplicação da substância de ensaio. No caso de se utilizar um veículo para facilitar a administração, este será administrado ao grupo de controlo da mesma forma que aos grupos tratados, devendo a dose corresponder à do grupo tratado com a dose mais elevada. A dose mais elevada será determinada de forma a produzir efeitos tóxicos mas nunca, ou raramente, a morte do animal. A dose mais baixa não deverá produzir quaisquer efeitos tóxicos. No caso de se dispor de informação sobre a exposição humana, a dose mais baixa deverá exceder esse valor. O ideal seria a dose intermédia produzir o efeito tóxico mínimo observado. No caso de se utilizar várias doses intermédias, a diferença entre elas será calculada de forma a conseguir-se uma gradação dos efeitos tóxicos. Nos grupos das doses mais baixa e intermédia, assim como nos grupos de controlo, a incidência da mortalidade deverá ser baixa para permitir uma avaliação significativa dos resultados.

No caso de a aplicação da substância de ensaio provocar uma grave irritação cutânea, dever-se-á reduzir as concentrações, o que poderá originar uma diminuição ou até um desaparecimento dos outros efeitos tóxicos da dose mais elevada. Se as lesões cutâneas forem muito graves, pode tornar-se necessário interromper a experiência e recomeçá-la com concentrações mais fracas.

1.6.2.4. *Teste-limite*

Se já tiver sido efectuada uma experiência preliminar com uma dose de 1 000 mg/kg ou com uma dose mais elevada em função da possibilidade de uma exposição humana conhecida, que não tenha provocado quaisquer efeitos tóxicos, será inútil prosseguir a experiência.

1.6.2.5. *Período de observação*

Os animais da experiência serão observados diariamente para se detectar manifestações de toxicidade. Proceder-se-á ao registo do momento da morte e do momento do aparecimento e do desaparecimento das manifestações de toxicidade.

▼B

1.6.3. **Procedimento**

Os animais serão colocados em gaiolas individuais. Em condições ideais a substância de ensaio será administrada aos animais sete dias por semana durante um período de 28 dias. Os animais de todos os grupos-satélite que forem objecto de observações complementares serão mantidos vivos durante mais 14 dias, sem tratamento, para se detectar a recuperação ou a persistência dos efeitos tóxicos. O tempo de exposição será pelo menos de seis horas por dia.

A substância de ensaio será aplicada uniformemente numa área equivalente a 10 % da superfície total do corpo. No caso de substâncias altamente tóxicas, a superfície a utilizar poderá ser menor mas a camada da substância deverá ser o mais fina e uniforme possível.

Durante a exposição a substância de ensaio é mantida em contacto com a pele por meio de uma gaze porosa e de um adesivo antialérgico. A superfície tratada será por sua vez convenientemente coberta de maneira a manter no seu lugar a gaze e a substância de ensaio e de modo a evitar que os animais ingiram a referida substância. É possível utilizar aparelhos de contenção para evitar a ingestão da substância, mas não se recomenda a imobilização completa. Como alternativa pode utilizar-se uma «coleira de protecção».

No fim do tempo de exposição é necessário, se possível, eliminar todos os resíduos da substância utilizando água ou recorrendo a qualquer outro método adequado para limpeza da pele.

Os animais serão observados diariamente, registando-se sempre as manifestações de toxicidade assim como o momento do seu aparecimento, a sua intensidade e a sua duração. Proceder-se-á à observação das modificações do pêlo e da pele, dos olhos e das mucosas, do aparelho respiratório, do aparelho circulatório, do sistema nervoso autónomo e central, assim como da actividade somatomotora e do comportamento. Determinar-se-á semanalmente o peso dos animais. Recomenda-se também que se determine semanalmente o consumo alimentar. Deve observar-se regularmente os animais para se evitar perdas, tanto quanto possível, causadas por canibalismo, autólise dos tecidos ou condições impróprias de alojamento. No fim da experiência todos os animais sobreviventes dos grupos tratados não satélites serão autopsiados. Os animais moribundos e os animais que apresentem graves sintomas de angústia ou dor deverão ser imediatamente retirados, sacrificados e submetidos a autópsia.

Os exames a seguir enunciados deverão ser efectuados no fim do período de ensaio para todos os animais incluindo os de controlo:

1. Um exame hematológico compreendendo os seguintes testes: hematócrito, concentração de hemoglobina, contagem de eritrócitos, contagem de leucócitos, fórmula leucocitária, bem como um estudo sobre o potencial de coagulação.

2. A determinação de dados bioquímicos do sangue incluindo pelo menos um parâmetro da função hepática e renal: alanina aminotransferase (inicialmente conhecida como transaminase glutâmico-pirúvica), aspartato aminotransferase (inicialmente conhecida como transaminase glutâmico-oxalo-acética), azoto ureico, albumina, creatinina plasmática, bilirrubina total e as proteínas séricas totais.

As outras análises eventualmente necessárias para uma avaliação toxicológica adequada incluem as análises de cálcio, fósforo, cloretos, sódio, potássio, glicose em jejum, análises de lípidos, de hormonas, equilíbrio ácido-básico, meta-hemoglobina e actividade colinesterásica.

▼B

Pode recorrer-se a outras análises bioquímicas clínicas sempre que necessário para melhorar a investigação dos efeitos observados.

1.6.4. **Autópsia**

Todos os animais submetidos a experiência deverão ser submetidos a uma autópsia geral. Pelo menos o fígado, os rins, as glândulas supra-renais e os testículos deverão ser pesados ainda húmidos, tão cedo quanto possível após a dissecação para se evitar a perda de líquidos por evaporação. Todos os órgãos e tecidos, isto é, pele normal e tratada, fígado, rins, baço, testículos, glândulas supra-renais, coração e órgãos-alvo (isto é, os órgãos que apresentem lesões graves ou variações de volume) deverão ser conservados num meio adequado para eventual exame histopatológico futuro.

1.6.5. **Exame histopatológico**

No grupo tratado com a dose mais elevada e no grupo de controlo deve efectuar-se o exame histológico dos órgãos e tecidos conservados. Os órgãos e tecidos que apresentem efeitos susceptíveis de serem atribuídos à substância de ensaio administrada na dose mais elevada deverão ser examinados em todos os grupos tratados com doses inferiores. Deve proceder-se a um exame histológico dos animais de qualquer grupo-satélite com particular ênfase sobre os órgãos e tecidos que apresentaram efeitos identificados nos outros grupos tratados.

2. **RESULTADOS**

Os resultados serão resumidos na forma de quadros indicando, para cada experiência, o número de animais no início do ensaio e o número de animais que apresenta cada tipo de lesão.

Todos os resultados observados deverão ser avaliados por um método estatístico apropriado. Pode ser utilizado qualquer método estatístico reconhecido.

3. **RELATÓRIO**

3.1. RELATÓRIO DO ENSAIO

O relatório do ensaio deverá conter, se possível, a informação seguinte:

— dados sobre os animais (espécie, estirpe, origem, condições ambientais, dieta, etc.),

— condições experimentais (incluindo o tipo de cobertura: oclusiva ou não oclusiva),

— doses (incluindo o veículo, se utilizado) e concentrações,

— dose sem efeito, se possível,

— resposta tóxica por sexo e por dose,

— momento da morte durante a experiência ou indicação dos animais sobreviventes no fim da experiência,

— efeitos tóxicos ou outros,

— momento da observação de qualquer manifestação anormal e sua evolução,

— dados relativos à alimentação e peso corporal,

— exames hematológicos efectuados e resultados,

▼B

— provas bioquímicas clínicas utilizadas e seus resultados,

— resultados da autópsia,

— descrição pormenorizada de todos os resultados histopatológicos,

— tratamento estatístico dos resultados, se possível,

— discussão dos resultados,

— interpretação dos resultados.

3.2. AVALIAÇÃO E INTERPRETAÇÃO

Ver Introdução Geral, parte B (ponto D).

4. **REFERÊNCIAS**

Ver Introdução Geral, parte B (ponto E).

▼M7

B.10. ENSAIO *IN VITRO* DE ABERRAÇÕES CROMOSSÓMICAS EM MAMÍFEROS

INTRODUÇÃO

O presente método de ensaio é equivalente ao *Test Guideline* 473 (2016) da OCDE. Faz parte integrante de uma série de métodos de ensaio no domínio da toxicologia genética. Está disponível um documento da OCDE que fornece informações sucintas sobre ensaios de toxicologia genética e resume as alterações recentemente efetuadas às orientações da OCDE nesse domínio (1).

O objetivo do ensaio *in vitro* de aberrações cromossómicas é identificar os produtos químicos que causam aberrações cromossómicas estruturais em culturas de células de mamíferos (2) (3) (4). As aberrações estruturais podem ser de dois tipos — cromossómicas ou cromatídicas. Em ensaios *in vitro* de aberrações cromossómicas pode observar-se poliploidia (incluindo endorreduplicação). Embora os aneugénios possam induzir a poliploidia, esta, por si só, não é um indicativo do potencial aneugénico, podendo indicar simplesmente uma perturbação do ciclo celular ou citotoxicidade (5). O presente ensaio não é concebido para detetar a aneuploidia. Para esse fim, é recomendável um ensaio *in vitro* de micronúcleos (6).

O ensaio *in vitro* de aberrações cromossómicas pode utilizar culturas de linhas celulares bem estabelecidas ou culturas primárias de células humanas ou de roedores. As células utilizadas devem ser selecionadas com base na sua capacidade de crescimento em cultura, na estabilidade do cariótipo (incluindo o número de cromossomas) e na frequência das aberrações cromossómicas espontâneas (7). Os dados atualmente disponíveis não permitem efetuar recomendações sólidas, mas sugerem que, ao avaliar os perigos químicos, é importante considerar o estatuto da proteína *p53*, a estabilidade genética (do cariótipo), a capacidade de reparação do ADN e a origem (roedores ou humanos) das células escolhidas para a realização do ensaio. Os utilizadores do presente método de ensaio são, assim, incentivados a ponderar a influência destas e de outras características celulares no desempenho de uma linha celular, ao detetarem a indução de aberrações cromossomáticas, dada a evolução constante dos conhecimentos nesta área.

As definições utilizadas figuram no apêndice 1.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES

Os ensaios *in vitro* necessitam, normalmente, de uma fonte exógena de ativação metabólica, a menos que as células sejam metabolicamente competentes em relação aos produtos químicos em estudo. O sistema exógeno de ativação metabólica não reproduz inteiramente as condições *in vivo*. Deve ter-se o cuidado de evitar condições que possam conduzir a falsos resultados positivos, ou seja, danos cromossomáticos não causados pela interação direta entre os produtos químicos em estudo e os cromossomas, condições essas que incluem alterações do pH ou da pressão osmótica (8) (9) (10), a interação com os componentes do meio (11) (12) ou níveis excessivos de citotoxicidade (13) (14) (15) (16).

O presente ensaio é utilizado para a deteção de aberrações cromossómicas que possam resultar de eventos clastogénicos. A análise da indução de aberrações cromossómicas deve utilizar células em metáfase. É, pois, essencial que as células atinjam a mitose tanto em culturas tratadas como não tratadas. No caso dos nanomateriais fabricados, podem ser necessárias adaptações específicas ao presente método de ensaio, que não são descritas no mesmo.

Antes da aplicação do método de ensaio a uma mistura para obter dados com fins regulamentares, importa ponderar se, e em caso afirmativo, por que motivo, o método pode proporcionar resultados adequados para o efeito. Tais considerações não são necessárias se existir um requisito regulamentar para o ensaio da mistura.

▼M7

PRINCÍPIO DO ENSAIO

Expõem-se culturas de células humanas ou de outros mamíferos ao produto químico em estudo, juntamente com uma fonte exógena de ativação metabólica e sem essa fonte, a menos que se utilizem células com capacidade metabólica adequada (ver ponto 13). Após um período adequado, pré-estabelecido, de exposição das células ao produto químico em estudo, adiciona-se um produto para o bloqueio em metáfase (por exemplo, Colcemid ou colquicina); as células em metáfase são colhidas, coradas e analisadas microscopicamente para detetar a presença de aberrações cromatídicas ou cromossómicas.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Preparações

Células

Podem utilizar-se várias linhas celulares — por exemplo, células de ovário de hamster chinês (CHO, do inglês *Chinese Hamster Ovary*), células pulmonares de hamster chinês (CHL, do inglês *Chinese Hamster Lung*)/IU, *TK6* — ou culturas celulares primárias, incluindo linfócitos do sangue periférico humano ou de outros mamíferos (7). A escolha das linhas celulares utilizadas deve ser justificada cientificamente. Se forem utilizadas células primárias, deve ponderar-se, sempre que possível e por razões de bem-estar dos animais, a utilização de células primárias de origem humana, obtidas em conformidade com os princípios éticos e regulamentares. Os linfócitos de sangue humano periférico devem provir de indivíduos jovens (18-35 anos), não fumadores, sem qualquer doença conhecida ou exposição recente a agentes genotóxicos (p. ex., produtos químicos, radiações ionizantes) a níveis suscetíveis de aumentar a incidência de base de aberrações cromossómicas. Desta forma, assegura-se uma incidência de base de aberrações cromossómicas baixa e coerente. A incidência de base de aberrações cromossómicas aumenta com a idade, sendo esta tendência mais pronunciada no sexo feminino do que no sexo masculino (17) (18). Se forem reunidas para utilização células de mais do que um dador, deve indicar-se o número de dadores. É necessário demonstrar que as células se dividiram desde o início do tratamento com o produto químico em estudo até à colheita das células. As culturas celulares são mantidas numa fase de crescimento exponencial (linhas celulares) ou estimuladas para se dividirem (culturas primárias de linfócitos), de forma a que as células sejam expostas em fases diferentes do ciclo celular, uma vez que a sensibilidade das fases celulares aos produtos químicos em estudo pode não ser conhecida. As células primárias que necessitam de ser estimuladas com agentes mitogénicos para se dividirem não são sincronizadas durante o período de exposição ao produto químico em estudo (caso, p. ex., dos linfócitos humanos após 48 horas de estimulação mitogénica). A utilização de células sincronizadas durante o tratamento não é recomendada, mas pode ser aceitável se se justificar.

Meios e condições de cultura

Devem manter-se as culturas em meios de cultura e condições de incubação adequados (tipo de recipiente, atmosfera humidificada com uma concentração de CO_2 de 5 %, se pertinente, temperatura de incubação 37 °C). As linhas celulares devem ser periodicamente verificadas quanto à estabilidade do número modal de cromossomas e à ausência de contaminação por micoplasmas (7) (19), não devendo ser utilizadas se se verificar que foram contaminadas ou que o número modal de cromossomas se alterou. A duração do ciclo celular normal das linhas celulares ou das culturas primárias utilizadas no laboratório de ensaio deve ser estabelecida e ser compatível com as características celulares publicadas (20).

Preparação das culturas

Linhas celulares: as células são propagadas a partir de culturas de arranque, inoculadas no meio de cultura a uma densidade tal que as células em suspensão ou em monocamadas continuem a crescer exponencialmente até ao momento da colheita (deve evitar-se, p. ex., a confluência no caso do crescimento de células em monocamadas).

▼M7

Linfócitos: cultiva-se (p. ex., durante 48 horas, no caso dos linfócitos humanos) sangue integral, tratado com um anticoagulante (p.. ex., heparina), ou linfócitos separados, na presença de um agente mitogénico (p. ex., fito-hemaglutinina — PHA — para linfócitos de origem humana) destinado a induzir a divisão celular, antes da exposição ao produto químico em estudo.

Ativação metabólica

Se forem utilizadas células com capacidade metabólica endógena inadequada, será necessário utilizar sistemas metabolizantes exógenos. O sistema mais geralmente utilizado e que se recomenda por defeito, exceto motivo em contrário, é uma fração pós-mitocondrial reforçada com co-fator (S9) preparada a partir de fígados de roedores (em geral, ratos) tratados com agentes de indução enzimática, como, por exemplo, Aroclor 1254 (21) (22) (23) ou uma mistura de fenobarbital e β-naftoflavona (24) (25) (26) (27) (28) (29). Esta última combinação não é contrária à Convenção de Estocolmo sobre Poluentes Orgânicos Persistentes (30) e comprovou-se ser tão eficaz na indução de oxidases de função mista como o Aroclor 1254 (24) (25) (26) (28). A fração S9 é habitualmente utilizada em concentrações na gama de 1 % a 2 %, mas pode ser aumentada para a 10 % (v/v) no meio de ensaio final. Durante o tratamento, deve evitar-se a utilização de produtos que reduzem o índice mitótico, em especial complexantes de cálcio (31). A escolha do tipo e da concentração de sistema exógeno de ativação metabólica ou do indutor metabólico utilizado pode ser influenciada pela classe dos produtos químicos em estudo.

Preparação do produto químico em estudo

Os produtos químicos sólidos devem ser adicionados a solventes adequados e, se necessário, ser diluídos antes do tratamento das células (ver ponto 23). Os produtos químicos líquidos podem ser adicionados diretamente ao sistema de ensaio e/ou diluídos antes de serem utilizados no tratamento do sistema de ensaio. Para o ensaio de produtos químicos gasosos ou voláteis, devem efetuar-se alterações adequadas aos protocolos normalizados, como o tratamento em recipientes de cultura fechados (32) (33) (34). A preparação do produto químico em estudo deve ser feita imediatamente antes do tratamento, a menos que os dados de estabilidade demonstrem que o mesmo pode ser armazenado.

Condições de realização do ensaio

Solventes

O solvente deve ser escolhido de modo a otimizar a solubilidade dos produtos químicos em estudo sem afetar negativamente a realização do ensaio, por exemplo, alterando o crescimento celular, afetando a integridade do produto químico em estudo, reagindo com os recipientes de cultura ou alterando o sistema de ativação metabólica. Sempre que possível, recomenda-se a utilização de um solvente (ou meio de cultura) aquoso. A água e o dimetilssulfóxido, por exemplo, são solventes cujo desempenho é bem conhecido. Os solventes orgânicos não devem exceder, em geral, 1 % (v/v), e os solventes aquosos (salinos ou água) não devem exceder 10 % (v/v) no meio de tratamento final. Se forem utilizados solventes cujo desempenho não é bem conhecido (p. ex., etanol ou acetona), devem fornecer-se dados que comprovem a respetiva compatibilidade com os produtos químicos e o sistema em estudo e a inexistência de genotoxicidade à concentração utilizada. Na ausência de dados comprovativos, é importante incluir amostras de controlo não tratadas (ver apêndice 1) para demonstrar que o solvente escolhido não tem efeitos deletérios ou clastogénicos.

Medição da proliferação celular e da citotoxicidade e escolha das concentrações de tratamento

Ao determinar a concentração máxima a ensaiar do produto químico em estudo, devem evitar-se concentrações capazes de gerar respostas positivas falsas, como as que produzam citotoxicidade excessiva (ver ponto 22), precipitações no meio de cultura (ver ponto 23) ou alterações pronunciadas do pH ou da pressão osmótica (ver ponto 5). Se, ao ser adicionado, o produto químico em estudo

▼M7

causar uma alteração pronunciada do pH do meio, o pH pode ser ajustado por tamponamento do meio final, de modo a evitar falsos resultados positivos e manter condições de cultura adequadas.

Efetuam-se medições da proliferação celular para garantir que um número suficiente de células tratadas atingiu a mitose durante o ensaio e que os tratamentos são efetuados a níveis adequados de citotoxicidade (ver pontos 18 e 22). A citotoxidade deve ser determinada na experiência principal tanto na presença como na ausência de um sistema de ativação metabólica, por recurso a um indicador adequado da morte e do crescimento celulares. Embora a avaliação da citotoxicidade num ensaio inicial possa ser útil para definir melhor as concentrações a utilizar no ensaio principal, esse ensaio não é obrigatório. Se for efetuado, não deve substituir a determinação da citotoxicidade no ensaio principal.

A duplicação da população em termos relativos (RPD, de «Relative Population Doubling») ou o aumento relativo da contagem celular (RICC, de «Relative Increase in Cell Count») são métodos adequados para a avaliação da citotoxicidade em ensaios citogenéticos (13) (15) (35) (36) (55) (ver fórmulas no apêndice 2). Em caso de tratamento a longo prazo e tempos de colheita após o início do tratamento superiores a 1,5 ciclos celulares normais (ou seja, mais de 3 ciclos celulares, no total), a RPD pode levar a uma subestimação da citotoxicidade (37). Nestas condições, a RICC pode constituir uma melhor estimativa; a avaliação da citotoxicidade após 1,5 ciclos celulares normais proporcionaria uma estimativa útil com recurso à RPD.

Relativamente aos linfócitos em culturas primárias, embora o índice mitótico (IM) seja uma medida dos efeitos citotóxicos/citostáticos, é influenciado pelo tempo decorrido após o tratamento, o agente mitogénico utilizado e as eventuais perturbações do ciclo celular. Contudo, o IM é aceitável porque as medições de citotoxicidade de outros tipos podem revelar-se fastidiosas ou impraticáveis, podendo não ser aplicáveis à população-alvo de linfócitos em crescimento devido à estimulação com PHA.

Embora a RICC e a RPD, no caso de linhas celulares, e o IM, no caso da cultura primária de linfócitos, sejam os parâmetros de citotoxidade recomendados, outros indicadores de citotoxicidade (p. ex., integridade das células, apóptose, necrose, ciclo celular) podem fornecer informações adicionais úteis.

Devem avaliar-se, pelo menos, três concentrações de ensaio (não incluindo os controlos positivos e do solvente) que cumpram os critérios de aceitabilidade em termos de citotoxicidade adequada, número de células, etc. Independentemente do tipo de células (linhas celulares ou culturas primárias de linfócitos), podem utilizar-se, para cada concentração de ensaio, replicados ou culturas de tratamento único. Embora seja aconselhável a utilização de culturas em duplicado, as culturas únicas são igualmente aceitáveis desde que seja contado o mesmo número total de células nas culturas única ou em duplicado. O recurso a uma única cultura é particularmente importante quando são avaliadas mais de três concentrações (ver ponto 31). Os resultados obtidos com as culturas replicadas independentes, a uma dada concentração, podem ser agrupados para fins de análise de dados (38). No caso dos produtos químicos que demonstrem pouca ou nenhuma citotoxicidade, são adequados intervalos entre concentrações espaçados por um fator de 2 a 3. Quando se observa citotoxicidade, as concentrações escolhidas devem abranger uma gama com início na concentração que produz citotoxicidade, conforme descrito no ponto 22, e inclua as concentrações às quais se observa pouca ou nenhuma citotoxicidade. Muitos produtos químicos em estudo apresentam curvas concentração-resposta com declive acentuado, pelo

▼M7

que, para obter dados a citotoxicidade baixa e moderada, ou para analisar em pormenor a relação dose-resposta, será necessário recorrer a concentrações menos espaçadas e/ou a mais de três concentrações (no caso de culturas únicas ou de replicados), em especial nas situações em que for necessário repetir o ensaio (ver ponto 47).

Se a concentração máxima se basear na citotoxicidade, a concentração mais elevada deverá visar 55 ± 5 % de citotoxicidade, utilizando os parâmetros de citotoxicidade recomendados (ou seja, a redução do RICC e RPD, no caso das linhas celulares, e a redução do IM, no caso das culturas primárias de linfócitos, para 45 ± 5 % da amostra de controlo negativa correspondente). Os resultados positivos observados apenas no segmento superior da gama de 55 ± 5 % de citotoxicidade devem ser interpretados com cuidado (13).

No caso de produtos químicos pouco solúveis que não sejam citotóxicos a concentrações inferiores à concentração insolúvel mínima, a maior concentração analisada deve produzir, no final do tratamento com a substância química em estudo, turbidez ou um precipitado visível a olho nu ou com o auxílio de um microscópio invertido. Mesmo no caso de se observar citotoxicidade acima da menor concentração insolúvel, é conveniente ensaiar uma única concentração que produza turbidez ou um precipitado visível, devido aos efeitos falsos que possam ser induzidos pelo precipitado. À concentração que produz um precipitado, devem tomar-se os devidos cuidados para assegurar que este não interfere com a realização do ensaio (p. ex., em termos de coloração ou contagem). Neste contexto, pode ser útil determinar a solubilidade no meio de cultura antes do ensaio.

Se não se observar precipitação nem citotoxicidade condicionante, a maior concentração ensaiada deve corresponder à menor das seguintes concentrações: 10 mM, 2 mg/ml ou 2 μl/ml (39) (40) (41). Se o produto químico em estudo não for de composição definida (caso, p. ex., de uma substância de composição desconhecida ou variável, de produtos de reação complexos ou de materiais biológicos (UVCB) (42), de extratos ambientais, etc.), a concentração de topo poderá ter de ser mais elevada (p. ex., 5 mg/ml) na ausência de citotoxicidade, para aumentar a concentração de cada um dos componentes. Importa, contudo, notar que estes requisitos podem diferir no caso de medicamentos para uso humano (43).

Grupos de controlo

Para cada colheita, devem também realizar-se controlos negativos paralelos (ver ponto 15), em que as células são expostas apenas ao solvente e ao meio de tratamento, procedendo-se do mesmo modo que num ensaio normal.

São necessários controlos positivos para demonstrar a capacidade do laboratório para identificar os clastogénios nas condições do protocolo de ensaio, bem como a eficácia do sistema exógeno de ativação metabólica, se pertinente. O quadro 1 apresenta exemplos de controlos positivos. Podem ser utilizados produtos químicos de controlo positivo alternativos, se tal se justificar. Dado que os ensaios de toxicidade genética com células de mamíferos *in vitro* são suficientemente normalizados, o recurso a controlos positivos pode limitar-se a um clastogénio que necessite de ativação metabólica. Desde que efetuada em simultâneo com o ensaio não-ativado, com a mesma duração de tratamento, esta resposta única do controlo positivo demonstrará a atividade do sistema de ativação metabólica e a capacidade de resposta do sistema de ensaio. No entanto, devem efetuar-se controlos positivos (sem S9) para os tratamentos a longo prazo, dado que a duração do tratamento diferirá da do ensaio com ativação metabólica. Cada amostra de controlo positiva deverá ser utilizada numa ou mais das concentrações a que se prevê um aumento detetável e reprodutível relativamente à base, a fim de demonstrar a sensibilidade do sistema de ensaio (ou seja, efeitos claros, mas que não permitam revelar de imediato ao operador a identidade das lâminas codificadas), e a resposta não deve ser comprometida pela citotoxicidade de modo a exceder os limites especificados no método de ensaio.

▼M7

Quadro 1

Produtos químicos de referência recomendados para avaliação da competência de um laboratório e para a seleção dos controlos positivos.

Categoria	Produto químico	N.º CAS
1. Clastogénios ativos sem ativação metabólica		
	Metanossulfonato de metilo	66-27-3
	Mitomicina C	50-07-7
	N-óxido de 4-nitroquinolina	56-57-5
	Arabinósido de citosina	147-94-4
2. Clastogénios que necessitam de ativação metabólica		
	Benzo(a)pireno	50-32-8
	Ciclofosfamida	50-18-0

PROCEDIMENTO DE ENSAIO

Tratamento com o produto químico em estudo

As células em proliferação são expostas ao produto químico em estudo na presença e na ausência de um sistema de ativação metabólica.

Intervalo de amostragem das culturas

Para uma avaliação exaustiva, necessária para concluir um resultado negativo, as três seguintes condições experimentais devem ser aplicadas utilizando um tratamento curto com e sem ativação metabólica e um tratamento longo sem ativação metabólica (ver pontos 43, 44 e 45):

— As células são expostas ao produto químico em estudo, sem ativação metabólica, durante 3-6 horas, sendo colhidas a intervalos equivalentes a cerca de 1,5 ciclos celulares normais, a partir do início da exposição (18),

— As células são expostas ao produto químico em estudo, com ativação metabólica, durante 3-6 horas, sendo colhidas a intervalos equivalentes a cerca de 1,5 ciclos celulares normais, a partir do início da exposição (18),

— As células são expostas continuamente, sem ativação metabólica, até à amostragem, decorrido um período equivalente a 1,5 ciclos celulares normais. Certos produtos químicos (p. ex. análogos dos nucleósidos) podem ser detetados mais facilmente com tempos de exposição/colheita superiores a 1,5 ciclos celulares normais (24).

Caso a aplicação de uma das referidas condições experimentais conduza a uma resposta positiva, pode não ser necessário investigar nenhum dos outros regimes de tratamento.

Preparação dos cromossomas

As culturas de célula são tratadas com Colcemid ou colquicina, geralmente durante 1-3 horas antes da colheita. Cada cultura de células é colhida e processada separadamente para a preparação dos cromossomas. Preparação dos cromossomas envolve o tratamento hipotónico das células, seguido de fixação e coloração. No final do tratamento de três a seis horas, podem estar presentes células

▼M7

mitóticas em monocamadas (identificáveis pela sua forma arredondada e por se destacarem da superfície). Por se destacarem com facilidade, estas células podem perder-se quando da remoção do meio com o produto químico em estudo. Se existirem provas de um aumento substancial do número de células mitóticas relativamente aos controlos, que indique um provável bloqueio da mitose, as células devem ser recolhidas por centrifugação e adicionadas de novo às culturas, de modo a evitar a perda de células que se encontrem em mitose, bem como o risco da ocorrência de aberrações cromossómicas, no momento da colheita.

Análise

Todas as lâminas, incluindo as dos controlos positivos e negativos, devem ser independentemente codificadas antes da análise microscópica para a deteção de aberrações cromossómicas. Uma vez que os processos de fixação dão frequentemente lugar à perda de cromossomas por uma determinada proporção das células em metáfase, as células contadas devem apresentar um número de centrómeros igual ao número modal ± 2.

Para se concluir que um produto químico em estudo dá um resultado claramente negativo, devem contabilizar-se, pelo menos, 300 metáfases bem espalhadas para cada concentração e para o controlo (ver ponto 45). A 300 células devem ser divididas equitativamente entre os replicados, quando forem utilizadas culturas em duplicado. Quando são utilizadas culturas simples por cada concentração (ver ponto 21), devem contar-se em cada cultura, pelo menos, 300 metáfases bem espalhadas. A contabilização de 300 células tem a vantagem de aumentar a representatividade estatística do ensaio, além de raramente permitir observar valores nulos (prevê-se que estes sejam da ordem de apenas 5 %) (44). O número de metáfases contabilizadas pode ser reduzido caso se observem números elevados de células com aberrações cromossómicas e o produto químico em estudo for considerado inequivocamente positivo.

As células com aberrações cromossómicas estruturais, incluindo e excluindo as lacunas, devem ser contabilizadas. As quebras e as lacunas são definidas no apêndice 1, cf. (45) (46). As aberrações cromatídicas e cromossómicas devem ser registadas separadamente e classificadas em subtipos (quebras, intercâmbios). Os procedimentos utilizados no laboratório devem assegurar que a análise de aberrações cromossómicas é efetuada por operadores com formação adequada, com avaliação interpares, se for caso disso.

Embora o objetivo do ensaio consista na deteção de aberrações cromossómicas estruturais, deve registar-se a frequência de poliploidia e de endorreduplicação, quando ocorram (ver ponto 2).

Proficiência do laboratório

A fim de estabelecer um nível de experiência suficiente antes da utilização rotineira do ensaio, o laboratório deve ter efetuado uma série de experiências com produtos químicos de referência positivos que atuem por diferentes mecanismos, bem como vários controlos negativos (utilizando vários solventes ou veículos). As respostas observadas nos controlos positivos e negativos devem ser coerentes com as referências bibliográficas. Este critério não é aplicável a laboratórios com a experiência, isto é, que disponham de uma base de dados históricos, como definido no ponto 37.

Deve investigar-se uma seleção de produtos químicos de controlo positivos (ver quadro 1 no ponto 26), aplicados em tratamentos de curta e de longa duração na ausência de ativação metabólica, bem como num tratamento curto na presença de ativação metabólica, a fim de demonstrar a proficiência para detetar produtos químicos clastogénicos e determinar a eficácia do sistema de ativação metabólica. A gama de concentrações dos produtos químicos selecionados deve ser escolhida de forma a proporcionar aumentos reprodutíveis e dependentes da concentração relativamente à base, de forma a demonstrar a sensibilidade e a gama dinâmica do sistema de ensaio.

▼M7

Dados históricos de controlo

O laboratório deve elaborar:

— Um historial da gama e distribuição dos controlos positivos,

— Um historial da gama e distribuição dos controlos negativos (amostras não tratadas, solvente).

Ao obter os primeiros dados para um historial de distribuição dos controlos negativos, os controlos negativos em paralelo devem ser coerentes com os dados de controlo publicados, caso existam. À medida que forem sendo adicionados mais dados experimentais à distribuição dos controlos, os controlos negativos em paralelo devem, de preferência, situar-se dentro dos limites de controlo de 95 % daquela distribuição (44) (47). A base de dados históricos de controlo negativo deve ser inicialmente constituída por um mínimo de 10 experiências, embora de preferência, seja constituída por, pelo menos, 20 experiências efetuadas em condições experimentais comparáveis. Os laboratórios devem utilizar métodos de controlo de qualidade como gráficos de controlo (p. ex., gráficos C ou gráficos de barras (48)), para identificar a variabilidade dos seus dados de controlo positivo e negativo e demonstrar que, no seu laboratório, a metodologia está «sob controlo» (44). Encontram-se na bibliografia (47) outras recomendações sobre a forma de obter e utilizar os dados históricos (critérios de inclusão e exclusão de dados em séries históricas e critérios de aceitação para um determinado ensaio).

Quaisquer alterações ao protocolo experimental devem ser ponderadas em função da sua coerência com as bases de dados históricos de controlo do laboratório. Quaisquer incoerências de monta devem traduzir-se na constituição de uma nova base de dados históricos de controlo.

Os dados relativos ao controlo negativo devem ser constituídos pela frequência de células com aberrações cromossómicas numa única cultura ou na soma dos replicados das culturas, como descrito no ponto 21. Os controlos negativos em paralelo devem, de preferência, situar-se dentro dos limites de controlo de 95 % da distribuição da base de dados históricos de controlo negativo do laboratório (44) (47). Se os dados do controlo negativo realizado em paralelo se situarem fora dos limites de controlo de 95 % podem ser aceitáveis para inclusão no historial de distribuição de controlo se não forem valores extremos e houver indícios de que o sistema de ensaio está «sob controlo» (ver ponto 37), bem como provas da inexistência de erros humanos ou técnicos.

RESULTADOS E RELATÓRIO

Apresentação dos resultados

Deve avaliar-se a percentagem de células com aberrações cromossómicas estruturais. As aberrações cromatídicas e cromossómicas, classificados em subtipos (quebras, intercâmbios), devem ser indicadas separadamente, com indicação do respetivo número e frequência, no respeitante às culturas experimentais e de controlo. A ocorrência de lacunas é registada e incluída no relatório separadamente, mas não é contabilizada para o cálculo da frequência total das aberrações. Deve registar-se a percentagem de poliploidia e/ou de células endorreduplicadas, sempre que ocorram.

Durante a experiência principal para a deteção de aberrações, devem ser registadas as medições da citotoxidade realizadas em paralelo com os ensaios, para todas as culturas de controlo e para os casos de resposta negativa e positiva.

Devem ser fornecidos dados individuais das culturas. Além disso, todos os dados devem ser apresentados sob a forma de um quadro.

Critérios de aceitabilidade

A aceitação do ensaio baseia-se nos seguintes critérios:

— A amostra de controlo negativo em paralelo é considerada aceitável para inclusão na base de dados históricos de controlo negativo do laboratório do modo descrito no ponto 39.

▼M7

— As amostras de controlo positivo (ver ponto 26) devem induzir respostas compatíveis com as incluídas na base de dados históricos de controlo positivo e produzir um aumento estatisticamente significativo relativamente ao controlo negativo em paralelo.

— Devem respeitar-se os critérios de proliferação celular no controlo com solvente (pontos 17 e 18).

— Foram testadas as três condições experimentais, salvo se uma delas produziu resultados positivos (ver ponto 28).

— É analisável um número adequado de células e concentrações (pontos 31 e 21).

— Os critérios para a seleção da concentração de topo são coerentes com os descritos nos pontos 22, 23 e 24.

Avaliação e interpretação dos resultados

Se forem cumpridos todos os critérios de aceitabilidade, o produto químico em estudo é considerado inequivocamente positivo se, em qualquer das condições experimentais examinadas (ver ponto 28):

a) pelo menos uma das concentrações de ensaio apresentar um aumento estatisticamente significativo em relação ao controlo negativo,

b) o aumento, avaliado com base numa análise de tendências adequada, for dependente da dose,

c) nenhum dos resultados está fora da distribuição dos dados históricos de controlo negativo (p. ex., limites de controlo de 95 % com base numa distribuição de Poisson; ver ponto 39).

Se todos estes critérios estiverem preenchidos, o produto químico em estudo é considerado passível de induzir aberrações cromossómicas em células de mamífero cultivadas no presente sistema de ensaio. As referências bibliográficas (49) (50) (51) contém recomendações sobre os métodos estatísticos mais adequados.

Se forem cumpridos todos os critérios de aceitabilidade, o produto químico em estudo é considerado inequivocamente negativo se, em todas as condições experimentais examinadas (ver ponto 28):

a) nenhuma das concentrações de ensaio apresentar um aumento estatisticamente significativo em relação ao controlo negativo,

b) não se observa nenhum aumento dependente da dose, avaliado com base numa análise de tendências adequada,

c) todos os resultados se situam dentro da distribuição dos dados históricos de controlo negativo (p. ex., limites de controlo de 95 % com base numa distribuição de Poisson; ver ponto 39).

O produto químico em estudo não é considerado passível de induzir aberrações cromossómicas em células de mamífero cultivadas no presente sistema de ensaio.

Não existe nenhuma exigência concreta para a verificação de uma resposta inequivocamente positiva ou negativa.

No caso de a resposta não ser inequivocamente positiva nem negativa como atrás descrito, ou para estabelecer a importância biológica do resultado, os dados devem ser avaliados por peritos e/ou uma investigação complementar. Neste contexto, pode ser útil a contagem de células adicionais (se adequado) ou a realização de uma nova experiência, eventualmente com alteração das condições experimentais (intervalo diferente entre as concentrações ou outras condições de ativação metabólica — p. ex., concentração ou origem do S9).

Em certos casos raros, mesmo após uma investigação complementar, os dados obtidos não permitirão concluir um resultado positivo ou negativo, pelo que se considerará que a resposta do produto químico em estudo é ambígua.

▼M7

Um aumento do número de células poliplóides pode indicar que o produto químico em estudo apresenta potencial de inibição da mitose e de indução de aberrações cromossómicas numéricas. Um aumento do número de células com cromossomas endorreduplicados pode indicar que o produto químico em estudo apresenta potencial de inibição da progressão do ciclo celular (54) (2) (ver ponto 2). Por conseguinte, deve registar-se separadamente a frequência de células poliploides e de células com cromossomas endorreduplicados.

Relatório de ensaio

Elementos a incluir no relatório de ensaio:

Produto químico em estudo:

— origem, número de lote e data-limite de utilização, se conhecida

— estabilidade do produto químico em estudo, se conhecida;

— solubilidade e estabilidade do produto químico em estudo no solvente, se conhecida;

— medição do pH, da pressão osmótica e da quantidade de precipitado no meio de cultura ao qual foi adicionado o produto químico em estudo, consoante o que for adequado.

Substância monocomponente:

— aspeto físico, solubilidade em água e outras propriedades físico-químicas relevantes;

— dados de identificação química, como as denominações IUPAC ou CAS, número CAS, código SMILES ou InChI, fórmula estrutural, pureza, identidade química das impurezas, se justificado e exequível, etc.

Substância multicomponentes, UVCB e misturas:

— caracterização, na medida do possível, da identidade química (ver acima), ocorrência quantitativa e propriedades físico-químicas relevantes dos componentes.

Solvente:

— justificação da escolha do solvente.

— deve igualmente indicar-se a percentagem de solvente no meio de cultura final.

Células:

— tipo e origem das células

— características do cariótipo e adequação do tipo de células utilizadas;

— ausência de micoplasmas, no caso das linhas celulares;

— no respeitante às linhas celulares, dados relativos à duração do ciclo celular, ao tempo de duplicação e ao índice de proliferação;

— sexo e idade dos dadores de sangue; quaisquer informações pertinentes sobre o dador, a utilização de sangue completo ou de linfócitos e o agente mitogénico utilizado;

— no respeitante às linhas celulares, número de passagens (se conhecido);

— no respeitante às linhas celulares, métodos de manutenção das culturas;

— no respeitante às linhas celulares, número modal de cromossomas.

▼M7

Condições de realização do ensaio:

— identificação e concentração do produto químico que bloqueia a metáfase; duração da exposição da célula,

— concentração do produto químico em estudo, expressa em concentração final no meio de cultura (p. ex., µg ou mg/ml ou mM do meio de cultura).

— justificação para a seleção das concentrações e do número de culturas, incluindo, por exemplo, dados sobre a citotoxicidade e sobre as limitações de solubilidade;

— composição dos meios e, quando aplicável, concentração de CO_2; teor de humidade;

— concentração (e/ou volume) de solvente e de produto químico em estudo adicionado ao meio de cultura;

— temperatura de incubação;

— tempo de incubação;

— duração do tratamento;

— tempo decorrido entre o tratamento e a colheita das células;

— densidade celular da cultura de arranque, quando aplicável;

— tipo e composição do sistema de ativação metabólica (fonte de S9, método de preparação da mistura de S9, concentração ou volume da mistura de S9 e de S9 no meio de cultura final, controlos de qualidade do S9);

— produtos químicos de controlo positivo e negativo; concentração final para cada condição de tratamento;

— métodos de preparação das lâminas e técnica de coloração utilizada;

— critérios de aceitabilidade dos ensaios;

— critérios de contabilização das aberrações;

— número de células em metáfase analisadas;

— métodos de medição da citotoxicidade;

— outros dados pertinentes relativos à citotoxicidade e ao método utilizado;

— critérios definidos para que o estudo seja considerado positivo, negativo ou não conclusivo;

— métodos utilizados para determinar o pH, a pressão osmótica e a precipitação.

Resultados:

— número de células tratadas e número de células colhidas por cultura, se forem utilizadas linhas celulares

— medições de citotoxidade (p. ex., RICC, RPD, IM); outras observações, se for caso disso;

— informações sobre a duração do ciclo celular, o tempo de duplicação e o índice de proliferação, no caso de linhas celulares;

— sinais de precipitação e instante da determinação;

▼M7

— definição das aberrações observadas, incluindo as lacunas;

— número de células contadas, número de células com aberrações cromossómicas e tipo dessas aberrações, discriminados para cada cultura exposta e de controlo, incluindo e excluindo lacunas;

— alterações da ploidia (células poliploides e as células com cromossomas endorreduplicados, apresentadas separadamente), se for caso disso;

— relação concentração-resposta, quando for possível determiná-la;

— dados (concentrações e solventes) relativos aos controlos em paralelo, negativo (solvente) e positivo;

— dados históricos relativos aos controlos negativo (solvente) e positivo, indicando intervalos, médias e desvios-padrão e limites de controlo de 95 % para a distribuição, bem como o número de dados;

— análise estatística; valores p (probabilidade de significância), caso sejam conhecidos.

Discussão dos resultados.

Conclusões.

BIBLIOGRAFIA

1) OCDE (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OCDE, Paris.

2) Evans, H.J. (1976), «Cytological Methods for Detecting Chemical Mutagens» in *Chemical Mutagens, Principles and Methods for their Detection*, Vol. 4, Hollaender, A. (ed.), Plenum Press, New York and London, pp. 1-29

3) Ishidate, M. Jr., T. Sofuni (1985), «The *in vitro* Chromosomal Aberration Test Using Chinese Hamster Lung (CHL) Fibroblast Cells in Culture» in *Progress in Mutation Research*, Vol. 5, Ashby, J. *et al*. (eds.), Elsevier Science Publishers, Amsterdam-New York- Oxford, pp. 427-432.

4) Galloway, S.M. *et al*. (1987), Chromosomal aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 10/suppl. 10, pp. 1-175.

5) Muehlbauer, P.A. *et al*. (2008), «Improving dose selection and identification of aneugens in the *in vitro* chromosome aberration test by integration of flow cytometry-based methods», *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 49/4, pp. 318-327.

6) Capítulo B.49 do presente anexo: Ensaio *in vitro* de micronúcleos em células de mamíferos.

7) ILSI paper (draft), Lorge, E., M. Moore, J. Clements, M. O Donovan, F. Darroudi, M. Honma, A. Czich, J van Benthem, S. Galloway, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Kim, D.J. Kirkland, Recommendations for good cell culture practices in genotoxicity testing.

8) Scott, D. *et al*. (1991), Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, Vol.257/2, pp. 147-204.

9) Morita, T. *et al*. (1992), Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 268/2, pp. 297-305.

10) Brusick, D. (1986), Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations, *Environmental and Molecular Mutagene*sis, Vol. 8/6, pp. 789-886.

▼**M7**

11) Long, L.H. *et al*. (2007), Different cytotoxic and clastogenic effects of epigallocatechin gallate in various cell-culture media due to variable rates of its oxidation in the culture medium, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis,* Vol. 634/1-2, pp. 177-183.

12) Nesslany, F. *et al*. (2008), Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 49/6, pp. 439-452.

13) Galloway, S. (2000), Cytotoxicity and chromosome aberrations *in vitro*: Experience in industry and the case for an upper limit on toxicity in the aberration assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, pp. 191-201.

14) Kirkland, D. *et al*. (2005), Evaluation of the ability of a battery of three *in vitro* genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens. I: Sensitivity, specificity and relative predictivity, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 584/1-2, pp. 1–256.

15) Greenwood, S. *et al*. (2004), Population doubling: a simple and more accurate estimation of cell growth suppression in the *in vitro* assay for chromosomal aberrations that reduces irrelevant positive results, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 43/1, pp. 36–44.

16) Hilliard, C.A. *et al*. (1998), Chromosome aberrations *in vitro* related to cytotoxicity of nonmutagenic chemicals and metabolic poisons, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 31/4, pp. 316–326.

17) Hedner K. *et al*. (1982), Sister chromatid exchanges and structural chromosomal aberrations in relation to age and sex, *Human Genetics*, Vol. 62, pp. 305-309.

18) Ramsey M.J. *et al*. (1995), The effects of age and lifestyle factors on the accumulation of cytogenetic damage as measured by chromosome painting, *Mutation Research*, Vol. 338, pp. 95-106.

19) Coecke S. *et al*. (2005), Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, *ATLA*, Vol. 33/3, pp. 261-287.

20) Henderson, L. *et al*. (1997), Industrial Genotoxicology Group collaborative trial to investigate cell cycle parameters in human lymphocyte cytogenetics studies, *Mutagenesis*, Vol.12/3, pp.163-167.

21) Ames, B.N., J. McCann, E. Yamasaki (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 31/6, pp. 347-363.

22) Maron, D.M., B.N. Ames (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 113/3-4, pp. 173-215.

23) Natarajan, A.T. *et al*. (1976), Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens after Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes, *Mutation Res*earch, Vol. 37/1, pp. 83-90.

24) Matsuoka, A., M. Hayashi, M. Jr. Ishidate (1979), Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *in vitro*, *Mutation Research/ /Genetic Toxicology*, Vol. 66/3, pp. 277-290.

25) Ong, T.-m. *et al*. (1980), Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver, *Journal of Environmental Pathology and Toxicology,* Vol. 4/1, pp. 55-65.

26) Elliot, B.M. *et al*. (1992), Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in vitro* Genotoxicity Assays, *Mutagenesis*, Vol. 7/3, pp. 175-177.

▼M7

27) Matsushima, T. *et al*. (1976), «A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems», in *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, de Serres, F.J. *et al*. (eds.), Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

28) Galloway, S.M. *et al*. (1994). Report from Working Group on *in vitro* Tests for Chromosomal Aberrations, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 312/3, pp. 241-261.

29) Johnson, T.E., D.R. Umbenhauer, S.M. Galloway (1996), Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9, *Environmental and Molecular Mutagenesis,* Vol. 28/1, pp. 51-59.

30) UNEP (2001), Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP). Disponível no seguinte endereço: http://www.pops.int/.

31) Tucker, J.D., M.L. Christensen (1987), Effects of anticoagulants upon sister-chromatid exchanges, cell-cycle kinetics, and mitotic index in human peripheral lymphocytes, *Mutation Research*, Vol. 190/3, pp. 225-8.

32) Krahn, D.F., F.C. Barsky, K.T. McCooey (1982), «CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids», in *Genotoxic Effects of Airborne Agents*, Tice, R.R., D.L. Costa, K.M. Schaich (eds.), Plenum, New York, pp. 91-103.

33) Zamora, P.O. *et al*. (1983), Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 5/6, pp. 795-801.

34) Asakura, M. *et al*. (2008), An improved system for exposure of cultured mammalian cells to gaseous compounds in the chromosomal aberration assay, *Mutation Research*, Vol. 652/2, pp. 122-130.

35) Lorge, E. *et al*. (2008), Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. I. Theoretical aspects, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 655/1-2, pp. 1-3.

36) Galloway, S. *et al*. (2011), Workshop summary: Top concentration for *in vitro* mammalian cell genotoxicity assays; and Report from working group on toxicity measures and top concentration for *in vitro* cytogenetics assays (chromosome aberrations and micronucleus), *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 723/2, pp. 77-83.

37) Honma, M. (2011), Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Vol. 724/1-2, pp. 86-87.

38) Richardson, C. *et al*. (1989), *Analysis of Data from In Vitro Cytogenetic Assays. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (ed.) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.

39) OCDE (2014), Document supporting the WNT decision to implement revised criteria for the selection of the top concentration in the *in vitro* mammalian cell assays on genotoxicity (Test Guidelines 473, 476 and 487) ENV/JM/TG(2014)17. Disponível mediante pedido.

40) Morita, T., M. Honma, K. Morikawa (2012), Effect of reducing the top concentration used in the *in vitro* chromosomal aberration test in CHL cells on the evaluation of industrial chemical genotoxicity, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 741/1-2, pp. 32-56.

41) Brookmire, L., J.J. Chen, D.D. Levy (2013), Evaluation of the Highest Concentrations Used in the In Vitro Chromosome Aberrations Assay, *Environmental and Molecular Muagenesis,* Vol. 54/1, pp. 36-43.

▼**M7**

42) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention (2011), Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances, http://www.epa.gov/ /opptintr/newchems/pubs/uvcb.txt.

43) USFDA (2012), International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use. Disponível no seguinte endereço: https:// federalregister.gov/a/2012-13774.

44) OCDE (2014), «Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS)», Series on Testing and Assessment, No. 198, OECD Publishing, Paris.

45) ISCN (2013), *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*, Schaffer, L.G., J. MacGowan-Gordon, M. Schmid (eds.), Karger Publishers Inc., Connecticut.

46) Scott, D. *et al*. (1990), «Metaphase chromosome aberration assays *in vitro*» in *Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Recommended Procedures*, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 62-86.

47) Hayashi, M. *et al*. (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control Data, *Mutation Research*, Vol. 723/2, pp. 87-90.

48) Ryan, T. P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement,* 2nd Edition, John Wiley and Sons, New York.

49) Fleiss, J. L., B. Levin, M.C. Paik (2003), *Statistical Methods for Rates and Proportions*, 3rd ed., John Wiley & Sons, New York.

50) Galloway, S.M. *et al*. (1987), Chromosome aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 10/suppl. 10, pp. 1-175.

51) Richardson, C. *et al*. (1989), «Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays» in *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.

52) Warr, T.J., E.M. Parry, J.M. Parry (1993), A comparison of two *in vitro* mammalian cell cytogenetic assays for the detection of mitotic aneuploidy using 10 known or suspected aneugens, *Mutation Research*, Vol. 287/1, pp. 29-46.

53) Locke-Huhle, C. (1983), Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest, *Mutation Research*, Vol. 119/3, pp. 403--413.

54) Huang, Y., C. Change, J.E. Trosko (1983), Aphidicolin — induced endoreduplication in Chinese hamster cells, *Cancer Research*, Vol. 43/3, pp. 1362--1364.

55) Soper, K.A., S.M. Galloway (1994), Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test, *Mutation Res*earch, Vol. 312, pp. 139-149.

▼M7

Apêndice 1

DEFINIÇÕES

Aneuploidia: desvio, num único ou em mais cromossomas, mas não por séries completas de cromossomas (poliploidia), do número diploide (ou haploide) normal de cromossomas.

Apoptose: morte celular programada, caracterizada por uma série de etapas conducentes à desintegração das células em partículas envolvidas por membranas, que são em seguida eliminadas por fagocitose ou excreção.

Proliferação celular: aumento do número de células por divisão celular mitótica.

Produto químico: substância ou mistura.

Quebra cromatídica: descontinuidade de um único cromatídeo em que se verifica um claro desalinhamento de um dos cromatídeos.

Lacuna cromatídica: região não corada (lesão acromática) de um único cromatídeo em que se verifica um desalinhamento mínimo do mesmo.

Aberração cromatídica: lesão estrutural de um cromossoma expressa na quebra, ou na quebra seguida de união, de cromatídeos simples.

Aberração cromossómica: lesão estrutural de um cromossoma expressa na quebra, ou na quebra seguida de união, de ambos os cromatídeos no mesmo local.

Clastogénio: produto químico causador de aberrações cromossomáticas estruturais em populações celulares ou organismos eucarióticos.

Concentrações: refere-se às concentrações finais do produto químico em estudo no meio de cultura.

Citotoxicidade: no respeitante aos ensaios abrangidos pelo presente método de ensaio que utilizam linhas celulares, a citotoxicidade é definida como uma redução na duplicação da população em termos relativos (RPD) ou um aumento da contagem celular (RICC) das células tratadas relativamente à amostra de controlo negativo (ver ponto 17 e apêndice 2). No respeitante aos ensaios abrangidos pelo presente método de ensaio que utilizam culturas primárias de linfócitos, a citotoxicidade é definida como uma redução do índice mitótico (IM) das células tratadas relativamente à amostra de controlo negativo (ver ponto 18 e apêndice 2).

Endorreduplicação: processo mediante o qual, na sequência de um período S de replicação do ADN, o núcleo não sofre mitose, iniciando-se um novo período S, que resulta em cromossomas com 4, 8, 16, … cromatídeos.

Genotóxico: termo geral que abrange todos os tipos de danos no ADN ou nos cromossomas, incluindo quebras, supressão de segmentos, aduções, ligações e alterações nucleotídicas, rearranjos, mutações génicas, aberrações cromossomáticas e aneuploidia. Nem todos os tipos de efeitos genotóxicos originam mutações ou danos cromossomáticos estáveis.

Índice mitótico (IM): relação entre o número de células em metáfase e o número total de células observadas numa população de células, que fornece uma indicação do grau de proliferação da população em causa.

Mitose: divisão do núcleo celular, habitualmente subdividida em prófase, prometáfase, metáfase, anáfase e telófase.

Mutagénico: que produz uma alteração hereditária de sequências de pares de bases do ADN em genes, ou da estrutura dos cromossomas (aberrações cromossomáticas).

▼M7

Aberração numérica: alteração do número de cromossomas relativamente ao número de cromossomas característico das células utilizadas.

Poliploidia: aberrações cromossomáticas numéricas em células ou organismos, que abrangem uma ou mais séries completas de cromossomas — por oposição à aneuploidia, que abrange um ou mais cromossomas.

Estatuto da proteína p53: A proteína p53 participa na regulação do ciclo celular, na apóptose e na reparação do ADN. As células com défice de proteína funcional p53, incapazes de bloquear o ciclo celular ou de eliminar as células danificadas por apóptose ou por outros mecanismos (p. ex., indução de reparação do ADN) relacionados com as funções do p53 em resposta a danos no ADN, devem, em teoria, ser mais atreitas a mutações genéticas ou a aberrações cromossómicas.

Aumento relativo da contagem celular («RICC», de «relative increase in cell count»): razão entre o aumento do número de células nas culturas expostas ao produto químico e o aumento do número de culturas não tratadas, expressa em percentagem.

Duplicação da população em termos relativos (em inglês «RPD», de «relative population doubling»): razão entre o aumento do número de duplicações de população nas culturas expostas ao produto químico e nas culturas não tratadas, expressa em percentagem.

Fração S9 de fígado: sobrenadante após centrifugação do homogeneizado de fígado a 9 000 g (extrato de fígado em bruto).

Mistura S9: mistura de fração S9 de fígado e co-fatores necessários à atividade enzimática metabólica.

Amostra de controlo do solvente: termo geral que define as culturas de controlo tratadas apenas com solvente, para dissolver o produto químico em estudo.

Aberração estrutural: alteração da estrutura dos cromossomas detetável por exame microscópico das células em metáfase, na forma de supressão de segmentos, de alterações de partes da sequência ou da troca de segmentos num cromatídeo ou entre cromatídeos.

Produto químico em estudo: Qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado o presente método de ensaio.

Amostras de controlo não tratadas: culturas que não sujeitas a qualquer tratamento (com um produto químico em estudo ou solvente), mas são processadas simultaneamente e do mesmo modo que as culturas sujeitas a tratamento com o produto químico em estudo.

▼M7

Apêndice 2

FÓRMULAS DE QUANTIFICAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

Índice mitótico (IM):

$$\mathbf{MI}(\%) = \frac{\text{Número de células mitóticas}}{\text{Número total de células contadas}} \times 100$$

Recomenda-se o recurso ao **aumento relativo da contagem celular (RICC)** ou à **duplicação da população em termos relativos (RPD)**, pois ambos os parâmetros têm em conta a proporção de células que sofreu divisão na população celular.

$$\mathbf{RICC}(\%) = \frac{(\text{Aumento do número de células nas culturas tratadas}(\text{final} - \text{início}))}{(\text{Aumento do número de células nas culturas de controlo}(\text{final} - \text{início}))} \times 100$$

$$\mathbf{RPD}(\%) = \frac{(\text{Nº de duplicações de população nas culturas tratadas})}{(\text{Nº de duplicações de população nas culturas de controlo})} \times 100$$

em que:

Duplicação da população = [log (n.º de células após tratamento ÷ n.º inicial de células)] ÷ log 2

Por exemplo, um RICC ou uma RPD de 53 % corresponde uma citotoxicidade/ /citóstase de 47 % e uma citotoxicidade/citóstase de 55 %, determinada com base no IM, indica que o IM real é de 45 % do controlo.

Em qualquer caso, deve determinar-se o número de células antes do tratamento, bem como nas culturas tratadas e de controlo negativo.

Embora o RCC (isto é, número de células nas culturas tratadas/culturas de controlo) tinha sido utilizado como parâmetro de citotoxicidade no passado, deixou de ser recomendado, uma vez que pode subestimar a citotoxicidade.

Nas culturas de controlo negativas, a duplicação da população deve ser compatível com a exigência de colher as células, após tratamento, num instante equivalente a 1,5 ciclos celulares normais, devendo o índice mitótico ser suficientemente elevado para obter um número suficiente de células em mitose e calcular de um modo fiável a redução de 50 %.

▼M7

B.11. ENSAIO DE ABERRAÇÕES CROMOSSÓMICAS EM CÉLULAS DA MEDULA DE MAMÍFEROS

INTRODUÇÃO

O presente método de ensaio é equivalente ao *Test Guideline* 475 (2016) da OCDE. Faz parte integrante de uma série de métodos de ensaio no domínio da toxicologia genética. Está disponível um documento da OCDE que fornece informações sucintas sobre ensaios de toxicologia genética e resume as alterações recentemente efetuadas às orientações da OCDE nesse domínio (1).

O ensaio *in vivo* de aberrações cromossómicas da medula óssea de mamíferos é particularmente importante para a avaliação da genotoxicidade, visto que, embora possam variar de espécie para espécie, os fatores do metabolismo *in vivo*, da farmacocinética e dos processos de reparação do ADN estão ativos e contribuem para as respostas. Os ensaios *in vivo* são igualmente úteis para a investigação suplementar da genotoxicidade detetada *in vitro*.

O ensaio de aberrações cromossómicas em células da medula de mamíferos é utilizado para a deteção de aberrações cromossómicas estruturais induzidas pelos produtos químicos em estudo em células da medula de animais, geralmente roedores — (2), (3), (4) e (5). As aberrações cromossómicas estruturais podem ser de dois tipos, um afetando os cromossomas, o outro os cromatídeos. Embora as aberrações genotóxicas induzidas por produtos químicos sejam, na sua maioria, cromatídicas, podem também ocorrer aberrações cromossómicas. As lesões cromossómicas e os eventos relacionados causam diversas doenças genéticas humanas, havendo provas substanciais de que, quando causam alterações nos oncogenes e nos genes supressores de tumores das células somáticas, estas lesões e os eventos relacionados têm influência na indução de cancro nos seres humanos e nos animais utilizados em experiências. Em ensaios de aberrações cromossómicas *in vivo* pode observar-se poliploidia (incluindo endorreduplicação). Contudo, o aumento da poliploidia, por si só, não é indicativo do potencial aneugénico, podendo indicar simplesmente uma perturbação do ciclo celular ou citotoxicidade. O presente ensaio não é concebido para detetar a aneuploidia. Os ensaios *in vivo* e *in vitro* recomendados para a deteção de aneuploidia são, respetivamente, o ensaio *in vivo* de micronúcleos em eritrócitos de mamíferos (capítulo B.12 do presente anexo) e o ensaio *in vitro* de micronúcleos em células de mamíferos (capítulo B.49 do presente anexo).

As definições utilizadas figuram no apêndice 1.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O presente ensaio utiliza, normalmente, roedores mas, em alguns casos, podem ser adequadas outras espécies, mediante justificação científica. A medula é o tecido objeto do ensaio, por se tratar de um tecido altamente vascularizado e conter uma população de células com grande ritmo de duplicação que podem ser facilmente isoladas e processadas. A justificação científica para a utilização de outras espécies que não ratos ou ratinhos deve constar do relatório. Se se utilizarem espécies que não sejam roedores, recomenda-se que a medição das aberrações cromossómicas da medula óssea seja integrada noutro ensaio de toxicidade adequado.

Se houver provas de que nem os produtos químicos em estudo nem os seus metabolitos entram em contacto com o tecido-alvo, o presente ensaio pode não ser adequado.

Antes da aplicação do método de ensaio a uma mistura para obter dados com fins regulamentares, importa ponderar se — e, em caso afirmativo, por que motivo — o método pode proporcionar resultados adequados para o efeito. Tais considerações são desnecessárias se houver um requisito regulamentar para o ensaio da mistura.

▼M7

PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

Os animais são expostos ao produto químico em estudo através de um modo de exposição apropriado. Ao cabo de um período pós-exposição adequado, eutanasiam-se (por métodos humanos). Antes da eutanásia, tratam-se com um agente fixador da metáfase (p. ex., colquicina ou colcemida). Fazem-se, seguidamente, preparações de cromossomas a partir de células da medula: após coloração, analisam-se as células em metáfase para detetar aberrações cromossómicas.

VERIFICAÇÃO DA PROFICIÊNCIA DO LABORATÓRIO

Determinação da proficiência

A fim de adquirir experiência suficiente com o ensaio antes da sua utilização rotineira, o laboratório deve demonstrar aptidão para reproduzir os resultados previstos com base nos dados publicados (p. ex., (6)), no respeitante à frequência das aberrações cromossómicas, com um mínimo de dois produtos químicos de controlo positivo (incluindo respostas fracas induzidas por baixas doses de controlos positivos), nomeadamente os resultados que constam do quadro 1, e com controlos compatíveis veículo/solvente (ver ponto 22). Nestas experiências devem utilizar-se doses que originem aumentos reprodutíveis e dependentes das doses e demonstrem a sensibilidade e a gama dinâmica do sistema de ensaio no tecido em causa (medula óssea), recorrendo ao método de classificação a utilizar no laboratório. Este requisito não é aplicável a laboratórios com experiência, isto é, que disponham de uma base de dados históricos, conforme definição nos pontos 10-14.

Dados históricos de controlo

Na determinação da proficiência, o laboratório deve estabelecer:

— um historial da gama e da distribuição dos controlos positivos, e

— um historial da gama e da distribuição dos controlos negativos.

Ao obter os primeiros dados para um historial da distribuição dos controlos negativos, os controlos negativos em paralelo devem ser coerentes com os dados de controlo eventualmente publicados. À medida que forem sendo adicionados mais dados experimentais ao historial de distribuição dos controlos, os controlos negativos em paralelo devem, de preferência, situar-se dentro dos limites de controlo de 95 % daquela distribuição. A base de dados históricos do laboratório sobre o controlo negativo deve ser estatisticamente sólida, a fim de garantir a capacidade do laboratório para avaliar a distribuição dos seus dados de controlo negativo. A bibliografia sugere que podem ser necessários, no mínimo, 10 ensaios, devendo, de preferência, efetuar-se, pelo menos, 20 ensaios em condições experimentais comparáveis. Os laboratórios devem utilizar métodos de controlo de qualidade como gráficos de controlo (p. ex., gráficos C ou gráficos de barras (7)), para identificar a variabilidade dos seus dados e demonstrar que, no seu laboratório, a metodologia está sob controlo. Encontram-se na bibliografia (8) outras recomendações sobre a forma de obter e utilizar os dados históricos (critérios de inclusão e exclusão de dados em séries históricas e critérios de aceitação para um determinado ensaio).

Se o laboratório não realizar um número suficiente de ensaios para estabelecer a distribuição estatisticamente sólida das amostras de controlo negativo (ver ponto 11) durante a determinação da proficiência (descrita no ponto 9), é aceitável que a distribuição possa ser definida nos primeiros ensaios de rotina. Esta abordagem deve seguir as recomendações enunciadas na bibliografia (8); os resultados de controlo negativo obtidos com estes ensaios devem ser coerentes com os dados de controlo negativo publicados.

▼M7

Quaisquer alterações ao protocolo experimental devem ser ponderadas em função do seu impacto nos dados resultantes, que devem permanecer coerentes com as bases de dados históricos de controlo de que o laboratório dispõe. Apenas as incoerências mais expressivas devem traduzir-se na criação de uma nova base de dados históricos de controlo, caso um parecer de perito determine que a distribuição difere da anterior (ver ponto 11). Durante o novo processo, pode não ser necessária uma base de dados de controlo negativo completa para permitir a realização de um ensaio real, desde que o laboratório possa demonstrar que os valores de controlo negativo em paralelo permanecem coerentes com a base de dados anterior ou com os correspondentes dados publicados.

Os dados de controlo negativo devem consistir na incidência de aberrações cromossómicas estruturais (excluindo lacunas) em cada animal. Os controlos negativos em paralelo devem, de preferência, situar-se dentro dos limites de controlo de 95 % da distribuição da base de dados históricos do laboratório sobre o controlo negativo. Os dados do controlo negativo realizado em paralelo que se situem fora dos limites de controlo de 95 % são aceitáveis para inclusão no historial de distribuição de controlo se não forem valores extremos e ainda se houver indícios de que o sistema de ensaio está «sob controlo» (ver ponto 11) e não houver indícios da existência de erros humanos ou técnicos.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Preparações

Escolha da espécie animal

Devem ser utilizados animais adultos, jovens e saudáveis das espécies de laboratório mais comuns. Utilizam-se geralmente ratos, embora possam também servir ratinhos. Pode utilizar-se qualquer outra espécie adequada de mamífero, se o relatório fornecer uma justificação científica.

Condições de alojamento e de alimentação dos animais

No caso dos roedores, a temperatura na sala onde se encontram os animais deve ser de 22 °C (± 3 °C). Embora a humidade relativa ideal seja de 50-60 %, na prática pode descer a 40 %, não devendo exceder 70 %, exceto durante a lavagem do biotério. A iluminação deve ser artificial, com uma alternância de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão. Na alimentação, podem utilizar-se dietas convencionais de laboratório e deve ser fornecida água de beber sem restrições. Se o produto químico em estudo for administrado pela alimentação, a escolha da dieta poderá ser condicionada pela necessidade de assegurar a dosagem adequada. Os roedores devem ser alojados em pequenos grupos (não mais de cinco por gaiola) do mesmo sexo e grupo de tratamento — caso não se preveja nenhum comportamento agressivo –, de preferência em gaiolas com pavimento sólido e enriquecimento ambiental adequado. Os animais só podem ser alojados individualmente se tal se justificar do ponto de vista científico.

Preparação dos animais

Utilizam-se, como regra geral, animais adultos jovens saudáveis (no caso dos roedores, idealmente com 6-10 semanas de idade no início do tratamento, embora sejam aceitáveis animais ligeiramente mais velhos), distribuídos aleatoriamente pelos grupos de controlo e pelos grupos de exposição. Os animais são identificados de forma inequívoca, utilizando um método humano minimamente invasivo (p. ex., colocação de anilhas, marcações, *microchips* ou identificação biométrica, mas sem cortes nas orelhas ou nas falanges) e devem ser aclimatados às condições de laboratório durante, pelo menos, cinco dias. As gaiolas devem ser dispostas de forma a minimizar possíveis efeitos derivados do seu posicionamento. Deve evitar-se a contaminação cruzada pelo controlo positivo e pelo produto químico em estudo. No início do estudo, a variação de peso entre os animais deve ser mínima, não excedendo ± 20 % do peso médio de cada sexo.

Preparação das doses

Os produtos químicos em estudo na forma sólida devem ser dissolvidos ou suspensos em solventes ou veículos adequados, ou ainda misturados na dieta ou na água potável antes da sua administração aos animais. Os produtos químicos em estudo líquidos podem ser administrados diretamente ou diluídos antes da

▼M7

sua administração. No caso de exposições por inalação, os produtos químicos em estudo podem ser administrados sob a forma de gás, vapor ou aerossol sólido/ /líquido, consoante as respetivas propriedades físico-químicas. Devem utilizar-se preparações frescas do produto químico em estudo, a menos que os dados de estabilidade demonstrem que o mesmo pode ser armazenado e determinem as condições de armazenagem adequadas.

Solvente/veículo

O solvente/veículo não deve produzir efeitos tóxicos nas doses utilizadas nem ser suscetível de reagir com o produto químico em estudo. Caso se utilizem solventes/veículos cujas propriedades não se encontrem totalmente elucidadas, devem fornecer-se dados que justifiquem a sua compatibilidade. Sempre que possível, recomenda-se a utilização prioritária de um solvente/veículo aquoso. A água, o soro fisiológico, uma solução de metilcelulose, uma solução de sal de sódio de carboximetilcelulose, o azeite e o óleo de milho constituem exemplos de solventes/veículos compatíveis de utilização comum. Na ausência de dados de controlo históricos ou publicados que demonstrem que o solvente/veículo atípico escolhido não induz nenhuma aberração estrutural ou outros efeitos deletérios, deve realizar-se um ensaio preliminar destinado a estabelecer a aceitabilidade do controlo do solvente ou veículo.

Controlos

Amostras de controlo positivas

Como regra geral, deve incluir-se em cada ensaio um grupo de animais expostos a um produto químico de controlo positivo. Este princípio pode não ser respeitado caso o laboratório de ensaio tenha demonstrado aptidão para a realização do ensaio e estabelecido um historial de gamas de controlos positivos. Se não for incluído um grupo de controlo positivo paralelo, cada experiência deve compreender controlos de contagem (lâminas fixas e não coradas). Estes podem ser realizados mediante a inclusão, no estudo, de amostras de referência adequadas obtidas e armazenadas a partir de um controlo positivo em separado efetuado a intervalos regulares (p. ex., todos os 6-18 meses), no laboratório em que o ensaio é realizado: por exemplo, em testes de proficiência e, subsequentemente, de uma forma regular, se necessário.

Os produtos químicos de controlo positivo devem produzir, de forma fiável, um aumento detetável na frequência das células com aberrações cromossómicas estruturais em relação ao nível de ocorrência espontânea. A dose de controlo positiva a administrar deve ser escolhida de modo a que os seus efeitos sejam claros mas também a que as amostras codificadas não sejam imediatamente identificadas pelo operador que procede às leituras. É aceitável que o controlo positivo seja administrado por uma via diferente da substância em estudo, de acordo com um calendário diferente, e que a amostragem seja realizada num único instante. Se se justificar, deve considerar-se a possibilidade de utilizar produtos químicos de uma classe relacionada para o controlo positivo. O quadro 1 inclui exemplos de produtos químicos de controlo positivo.

Quadro 1

Exemplos de substâncias de controlo positivo

Produto químico	N.º CAS
Metanossulfonato de etilo	62-50-0
Metanossulfonato de metilo	66-27-3
Etilnitrosureia	759-73-9
Mitomicina C	50-07-7
Ciclofosfamida mono-hidratada	50-18-0 (6055-19-2)
Trietilenomelamina	51-18-3

▼M7

Controlos negativos

Todas as amostragens devem incluir animais do grupo de controlo negativo, tratados do mesmo modo que os animais dos grupos de exposição, exceto o facto de não serem expostos à substância química em estudo. Se se utilizar um solvente/veículo para administrar o produto químico em estudo, o grupo de controlo deve receber esse solvente/veículo. No entanto, se os dados históricos de controlo negativo demonstrarem, para cada tempo de amostragem e laboratório de ensaio, a coerência da variabilidade entre animais e da frequência de células com aberrações estruturais, pode ser necessária apenas uma amostra de controlo negativo. Em caso de recurso a uma única amostragem para os controlos negativos, esta deve corresponder ao primeiro tempo de amostragem utilizado no estudo.

PROCEDIMENTO DE ENSAIO

Número e sexo dos animais

Em geral, a resposta do micronúcleo é idêntica nos machos e nas fêmeas (9), prevendo-se que o mesmo se verifique no caso das aberrações cromossómicas estruturais; por conseguinte, os estudos podem, na sua maioria, ser realizados com animais de qualquer sexo. A existência de dados que demonstrem diferenças importantes entre machos e fêmeas (p. ex., diferenças em termos de toxicidade sistémica, metabolismo, biodisponibilidade, toxicidade para a medula óssea, etc., que incluam, nomeadamente, um estudo exploratório) recomenda a utilização de animais de ambos os sexos. Neste caso, poderá ser adequado um estudo com ambos os sexos: por exemplo, no contexto de um estudo de toxicidade de dose repetida. Pode justificar-se o recurso ao modelo fatorial caso se utilizem animais de ambos os sexos. O apêndice 2 debruça-se sobre a análise dos dados por recurso a este modelo.

A dimensão dos grupos deve ser estabelecida no início do estudo, para que se disponha de um mínimo de 5 animais analisáveis de um sexo ou (se se utilizarem ambos os sexos) de cada sexo, por grupo. Nos casos em que a exposição humana aos produtos químicos possa ser específica de cada sexo, como acontece com alguns produtos farmacêuticos, o ensaio deve ser executado com animais do sexo em causa. A título de orientação, um estudo com medula óssea realizado com dois tempos de amostragem, três grupos de doses e um grupo de controlo negativo em paralelo, além de um grupo de controlo positivo (composto por cinco animais do mesmo sexo), necessita, no máximo, de 45 animais.

Doses

Se for realizado um estudo preliminar para avaliação da gama de doses a administrar, por não estarem disponíveis dados apropriados de apoio à seleção de doses, esse estudo deve ter lugar no mesmo laboratório, utilizando a mesma espécie, a mesma linha celular, o mesmo sexo e o mesmo regime de exposição do estudo principal (10). O estudo deve procurar identificar a dose máxima tolerável (DMT), definida como a dose mais elevada que se tolera sem sinais de toxicidade limitativa do estudo, relativamente à sua duração (p. ex., induzindo quebras do peso corporal ou citotoxicidade para o sistema hematopoiético), mas sem causar a morte nem sinais de dor, sofrimento ou tensão que levem à eutanásia por meios humanos (11).

Pode igualmente definir-se dose mais elevada como uma dose que produz indicações de toxicidade para a medula óssea.

Os produtos químicos que apresentam saturação de propriedades toxicocinéticas ou induzem processos de desintoxicação passíveis de conduzir a uma diminuição da exposição após um tratamento a longo prazo podem constituir uma exceção aos critérios de base de fixação da dose, devendo ser avaliados numa base casuística.

Um estudo completo destinado a obter informação sobre a resposta às doses deve incluir um grupo de controlo negativo e, no mínimo, três doses espaçadas, geralmente, por um fator de 2, mas não superior a 4. Se o produto químico em estudo não produzir efeitos tóxicos num estudo de avaliação da gama de

▼M7

doses ou com base em dados existentes, a dose mais elevada administrada de uma só vez deve ser de 2 000 mg/kg de peso corporal. Contudo, se o produto químico em estudo não provocar toxicidade, a DMT deve coincidir com a dose máxima administrada, e as doses utilizadas devem, de preferência, abranger uma gama compreendida entre a dose que produz a toxicidade máxima e uma dose que produz uma toxicidade baixa ou nula. Caso se observe toxicidade no tecido-alvo (medula óssea) com todas as doses de ensaio, recomenda-se a realização de um estudo complementar com doses não tóxicas. Os estudos destinados a caracterizar de modo mais preciso a informação quantitativa dose-resposta podem exigir outras gamas de doses. Estes limites podem variar para certos tipos de produtos químicos em estudo abrangidos por exigências específicas (p. ex., medicamentos para uso humano).

Ensaio no limite

Se os estudos de avaliação da gama de doses ou dados existentes relativos a espécies animais afins indicarem que um regime de tratamento com, pelo menos, a dose-limite (adiante descrita) não produz efeitos tóxicos observáveis (entre os quais a inibição da proliferação da medula óssea ou outros sinais de citotoxicidade no tecido-alvo) e não for de prever a ocorrência de genotoxicidade, com base em estudos de genotoxicidade *in vitro* ou dados referentes a produtos químicos estruturalmente afins, pode não ser necessário um estudo completo com três doses, desde que se tenha demonstrado que o(s) produto(s) químico(s) em estudo atinge(m) o tecido-alvo (medula óssea). Em tais casos, pode ser suficiente uma dose única (a dose-limite). Para um período de administração superior a 14 dias, a dose-limite é de 1 000 mg/kg de peso corporal/dia. Para períodos de administração iguais ou inferiores a 14 dias, a dose-limite é de 2 000 mg/kg de peso corporal/dia.

Administração das doses

Na conceção de um ensaio, deve ponderar-se a via prevista de exposição humana. Por conseguinte, podem escolher-se, com justificação, vias de exposição como a alimentação, a água de beber, as vias tópica, subcutânea, intravenosa e oral (por sonda gástrica), a inalação, a via intratraqueal ou os implantes. Em qualquer caso, a via deve ser escolhida de modo a garantir a exposição adequada do(s) tecido(s)-alvo. A injeção intraperitoneal, não é, em geral, recomendada, pois não se trata de uma via prevista de exposição humana, só devendo utilizar-se com justificação científica específica. Se o produto químico em estudo for misturado na alimentação ou na água de beber, especialmente no caso de dose única, deve ter-se o cuidado de prever um intervalo suficiente entre a ingestão dos alimentos ou da água e a amostragem, para permitir detetar os efeitos (ver pontos 33-34). O volume máximo de líquido que pode ser administrado por gavagem (sonda gástrica) ou por injeção, numa toma, depende do tamanho do animal, não devendo exceder 1 ml/100 g de peso corporal; excetuam-se as soluções aquosas, que podem ser administradas na proporção máxima de 2 ml/100 g de peso corporal. Deve justificar-se a utilização de volumes mais elevados. Exceto no caso de produtos químicos irritantes ou corrosivos, que normalmente produzem efeitos exacerbados em concentrações superiores, a variabilidade no volume de ensaio deve ser minimizada ajustando a concentração de modo a garantir a administração a um volume constante relativamente à massa corporal, em todas as doses.

Programação do ensaio

Os produtos químicos em estudo são geralmente administrados numa exposição única, podendo, contudo, ser administrados em dose dividida (ou seja, duas ou mais exposições no mesmo dia, separadas por não mais de 2-3 horas), para facilitar a administração de grandes volumes. Nestas circunstâncias, ou no caso da administração do produto químico por inalação, a amostragem deve ser programada em função do momento da última administração ou do termo da exposição.

Há poucos dados disponíveis sobre a adequação ao presente ensaio de um protocolo por doses repetidas. Contudo, nos casos em que for desejável integrar este ensaio com um ensaio de toxicidade de dose repetida, deve ter-se o cuidado de evitar a perda de células mitóticas com danos cromossomáticos, passível de

▼M7

ocorrer com doses tóxicas. Essa integração é aceitável se a dose mais elevada for igual ou superior à dose-limite (ver ponto 29) e for administrado um grupo de doses que abranja a dose-limite durante o período de tratamento. O ensaio do micronúcleo (método B.12) deve considerar-se o ensaio *in vivo* recomendado de aberrações cromossómicas quando se pretende a integração com outros estudos.

As amostras de medula óssea devem ser colhidas em dois momentos diversos após um único tratamento. No caso dos roedores, a primeira amostra deve ser colhida após o tempo necessário para completar 1,5 ciclos celulares normais, que é, normalmente, de 12-18 horas após a exposição. Dado que o tempo necessário para a absorção e para o metabolismo do(s) produto(s) químico(s) em estudo, bem como o seu efeito sobre a cinética do ciclo celular, podem afetar o momento ótimo para a deteção de uma eventual aberração cromossómica, recomenda-se a recolha de uma segunda amostra 24 horas após a primeira. A primeira amostragem para análise deve abranger todos os grupos de doses; no entanto, na(s) amostragem(ns) posterior(es) só será necessário administrar a dose mais elevada. Se, com justificação científica, forem utilizados regimes de administração ao longo de mais de um dia, deve, geralmente, colher-se uma amostra a cerca de 1,5 ciclos celulares normais após a exposição final.

Após a exposição e antes da amostragem, os animais são injetados intraperitonealmente com uma dose apropriada de um agente fixador da metáfase (por exemplo, colcemida ou colquicina), sendo as amostras colhidas após um período adequado. No caso dos ratinhos, esse período é de cerca de 3-5 horas e, no caso dos ratos, de 2-5 horas. As células da medula são colhidas, dilatadas, fixadas, coloridas e analisadas para deteção de aberrações cromossómicas.

Exames

Devem ser feitas observações clínicas gerais dos animais em estudo, registando-se os respetivos sinais clínicos pelo menos uma vez por dia, de preferência à(s) mesma(s) hora(s), tendo em conta o período de pico dos efeitos previstos após a administração da dose. Durante o período de exposição, devem observar-se todos os animais pelo menos duas vezes por dia, para a deteção de sinais de morbilidade e mortalidade. Todos os animais devem ser pesados no início do estudo, bem como, pelo menos, uma vez por semana (em estudos com doses repetidas) e no momento da eutanásia. Nos estudos com a duração mínima de uma semana, o consumo de alimentos deve ser medido pelo menos uma vez por semana. Se o produto químico em estudo for administrado através da água de beber, deve medir-se o consumo desta em cada mudança de água e pelo menos uma vez por semana. Os animais que exibam indicadores não letais de toxicidade excessiva devem ser eutanasiados (por métodos humanos) antes da conclusão do período de ensaio (11).

Exposição dos tecidos-alvo

Sempre que se justifique e nos casos em que não haja outros dados de exposição (ver ponto 44), deve colher-se uma amostra de sangue em momentos oportunos, a fim de permitir a determinação dos níveis dos produtos químicos em estudo no plasma, tendo em vista comprovar que ocorreu exposição da medula óssea.

Preparação da medula óssea e dos cromossomas

Imediatamente após a eutanásia (por métodos humanos), retiram-se células da medula óssea dos fémures ou das tíbias dos animais, expõem-se a uma solução hipotónica e fixam-se. As células em metáfase são depois espalhadas nas lâminas e coradas por métodos bem definidos [ver (3) (12)].

▼M7

Análise

Todas as lâminas, incluindo as dos controlos positivos e negativos, devem ser codificadas independentemente antes da análise, a qual deve ser realizada de forma aleatória, para que o operador não conheça o tipo de tratamento.

Como medida da citotoxicidade, deve determinar-se o índice mitótico em pelo menos 1 000 células por animal, para todos os animais expostos à substância em estudo (incluindo os controlos positivos), para os animais não expostos e para os animais não expostos do controlo negativo com o veículo/solvente.

Devem analisar-se, pelo menos, 200 metáfases por animal, para pesquisa de aberrações cromossómicas estruturais, incluindo e excluindo lacunas (6). No entanto, se os dados históricos relativos ao controlo negativo indicarem que a frequência de aberrações cromossómicas estruturais de fundo no laboratório de ensaio é < 1 %, deve ponderar-se a contagem de células adicionais. Devem registar-se separadamente as aberrações cromatídicas e cromossómicas, classificando-as em subtipos (quebras, intercâmbios). Os procedimentos utilizados no laboratório devem assegurar que a análise de aberrações cromossómicas é efetuada por operadores com formação adequada, com avaliação interpares se for caso disso. Dado que os procedimentos de preparação das lâminas dão frequentemente lugar à rutura de uma determinada proporção das células em metáfase, com perda dos cromossomas, as células contabilizadas devem, portanto, conter um número de centrómeros não inferior a $2n\pm2$, em que n é o número de cromossomas haploides na espécie em causa.

RESULTADOS E RELATÓRIO

Tratamento dos resultados

Os dados respeitantes a cada animal devem ser apresentados num quadro. Para cada animal, devem fornecer-se o índice mitótico, o número de células em metáfase contabilizadas, o número de aberrações por cada célula em metáfase e a percentagem de células com aberrações cromossómicas estruturais. Os diferentes tipos de aberração cromossómica estrutural devem ser enumerados, com os respetivos números e frequências, para os grupos expostos à substância em estudo e os grupos de controlo. Registam-se separadamente as lacunas, bem como as células poliploides e as células com cromossomas endorreduplicados. A frequência das lacunas é incluída no relatório, mas em geral não é tida em conta na análise da frequência total das aberrações estruturais. Se não houver diferença visível entre os sexos no tocante à resposta, os dados podem ser combinados para fins estatísticos. Devem também comunicar-se os resultados da toxicidade em animais e os sinais clínicos.

Critérios de aceitabilidade

Critérios para determinar a aceitabilidade do ensaio:

a) Os dados relativos à amostra de controlo negativo em paralelo são considerados aceitáveis para inclusão na base de dados históricos de controlo do laboratório (ver pontos 11-14).

b) Os controlos positivos ou os controlos de contagem em paralelo devem induzir respostas compatíveis com as incluídas na base de dados históricos de controlo positivo e produzir um aumento estatisticamente significativo em comparação com o controlo negativo (ver pontos 20-21).

c) O número de doses e células analisadas foi o adequado.

d) Os critérios para a seleção da dose mais elevada são coerentes com os descritos nos pontos 25-28.

Avaliação e interpretação dos resultados

Caso se cumpram todos os critérios de aceitabilidade, o produto químico em estudo é considerado inequivocamente positivo se:

▼M7

a) Pelo menos um dos grupos de tratamento apresenta um aumento estatisticamente significativo da frequência de células com aberrações cromossómicas estruturais (excluindo lacunas), em comparação com o controlo negativo.

b) Esse aumento, avaliado por recurso a uma análise adequada de tendências, depende da dose em, pelo menos, um dos tempos de amostragem.

c) Todos os resultados estão fora da distribuição dos dados históricos de controlo negativo (p. ex., limites de controlo de 95 % com base numa distribuição de Poisson).

Se, num determinado tempo de amostragem, apenas se analisar a dose mais elevada, o produto químico em estudo é considerado claramente positivo caso se verifique um aumento estatisticamente significativo em comparação com o controlo negativo em paralelo e os resultados se situem fora da distribuição dos dados históricos de controlo negativo (p. ex., limites de controlo de 95 % com base numa distribuição de Poisson). A referência bibliográfica (13) contém recomendações sobre os métodos estatísticos adequados. Quando se efetua um estudo da resposta à dosagem, devem analisar-se, pelo menos, três grupos de doses tratados. Os testes estatísticos utilizados devem considerar que o animal constitui a unidade experimental. Um resultado positivo no ensaio de aberrações cromossómicas indica que o produto químico em estudo induz aberrações cromossómicas estruturais na medula óssea das espécies ensaiadas.

Se se cumprirem todos os critérios de aceitabilidade, o produto químico em estudo é considerado inequivocamente negativo caso, em todas as condições experimentais examinadas:

a) Nenhum dos grupos de tratamento apresente um aumento estatisticamente significativo da frequência de células com aberrações cromossómicas estruturais (excluindo lacunas), em comparação com o controlo negativo,

b) Não se observe nenhum aumento dependente da dose, avaliado com base numa análise de tendências adequada, para qualquer tempo de amostragem,

c) Todos os resultados se situem dentro da distribuição dos dados históricos de controlo negativo (p. ex., limites de controlo de 95 % com base numa distribuição de Poisson), e

d) Se verifique a exposição da medula ao(s) produto(s) químico(s) em estudo.

A referência bibliográfica (13) contém recomendações sobre os métodos estatísticos mais adequados. A prova da exposição das células da medula a um produto químico em estudo pode consistir numa depressão do índice mitótico ou na medição dos níveis do produto químico no plasma ou no sangue. Em caso de administração intravenosa, não são necessárias provas da exposição. Alternativamente, podem utilizar-se dados ADME obtidos no âmbito de um estudo independente, com recurso à mesma via e à mesma espécie, para demonstrar que ocorreu exposição da medula óssea. Um resultado negativo indica que, nas condições do ensaio, o produto químico em estudo não induz aberrações cromossómicas estruturais nas células da medula das espécies sujeitas ao ensaio.

Não há nenhuma exigência concreta para a verificação de uma resposta positiva clara ou de uma resposta negativa clara.

Nos casos em que a resposta não for inequivocamente negativa ou positiva, a fim de contribuir para a definição da importância biológica dos resultados (p. ex., um aumento ténue ou no limite), os dados devem ser avaliados por pareceres de peritos e/ou investigações complementares das experiências concluídas. Em alguns casos, poderá ser útil analisar mais células ou repetir o ensaio alterando as condições experimentais.

▼M7

Em certos casos raros, mesmo após uma investigação complementar, os dados obtidos não permitem concluir um resultado positivo ou negativo, pelo que se considerará que o produto químico em estudo produz uma resposta ambígua.

A frequência de poliploidia e de metáfases endorreduplicadas entre as metáfases totais deve ser registada separadamente. Um aumento do número de células poliploides ou endorreduplicadas pode indicar que o produto químico em estudo apresenta o potencial de inibir a mitose ou a progressão do ciclo celular (ver ponto 3).

Relatório do ensaio

Elementos a incluir no relatório de ensaio:

Resumo

Produto químico em estudo:

— origem, número de lote e data-limite de utilização, se conhecida;

— estabilidade do produto químico em estudo, se conhecida.

Substância monocomponente:

— aspeto físico, solubilidade em água e outras propriedades físico-químicas relevantes;

— dados de identificação química, como as denominações IUPAC ou CAS, número CAS, código SMILES ou InChI, fórmula estrutural, pureza, identidade química das impurezas, se pertinente e exequível, etc.

Substância multicomponente, UVCB e misturas:

— caracterização, na medida do possível, da identidade química (ver acima), ocorrência quantitativa e propriedades físico-químicas relevantes dos componentes.

Preparação do produto químico em estudo:

— justificação da escolha do veículo;

— solubilidade e estabilidade do produto químico em estudo no solvente/veículo, se conhecida;

— preparação de fórmulas para a alimentação, a água de beber ou a inalação;

— determinações analíticas sobre essas fórmulas (p. ex.: estabilidade, homogeneidade, concentrações nominais), se efetuadas;

Animais utilizados no ensaio:

— espécie e estirpe utilizadas e justificação da utilização;

— número, idade e sexo;

— proveniência, condições de alojamento, dieta, etc.;

— método de identificação específica dos animais;

— para estudos de curta duração: peso de cada animal no início e no final do ensaio; para estudos de duração superior a uma semana: peso corporal de cada animal durante o estudo e consumo de alimentos. Deve incluir-se, relativamente a cada grupo, a gama de pesos corporais, com a respetiva média e o desvio-padrão.

▼M7

Condições de realização do ensaio:

— controlos positivos e negativos (veículo/solvente);

— dados do estudo para definição da gama de doses, se tiver sido realizado;

— fundamentação da escolha das doses;

— elementos relativos à preparação do produto químico em estudo;

— elementos relativos à administração do produto químico em estudo;

— fundamentação da escolha da via de administração e sua duração;

— métodos para verificar se o(s) produto(s) químico(s) em estudo atingiu(ram) a circulação geral ou a medula óssea;

— dose real (mg/kg de peso corporal/dia), calculada a partir da concentração do produto químico nos alimentos ou na água de beber (ppm) e do consumo, se aplicável;

— pormenores relativos à qualidade dos alimentos e da água;

— método de eutanásia;

— método analgésico (se utilizado);

— descrição detalhada dos calendários de tratamento e amostragem e justificação das escolhas feitas;

— métodos de preparação das lâminas;

— métodos de medição da toxicidade;

— identidade do agente fixador da metáfase, sua concentração, dose e tempo de administração antes da colheita das amostras;

— procedimentos para o isolamento e a conservação das amostras;

— critérios de contabilização das aberrações;

— número de células em metáfase analisadas por animal e número de células analisadas para a determinação do índice mitótico;

— critérios de aceitabilidade do estudo;

— critérios definidos para que o estudo seja considerado positivo, negativo ou inconclusivo;

Resultados:

— condição do animal antes e durante o período de ensaio, incluindo sinais de toxicidade;

— índice mitótico, discriminado para cada animal;

— tipo e número de aberrações e de células aberrantes, discriminados para cada animal,

— número total de aberrações em cada grupo, com as respetivas médias e desvios-padrão;

— número de células aberrantes em cada grupo, com as respetivas médias e desvios-padrão;

— alterações da ploidia, quando observadas, incluindo as frequências de poliploidia e/ou de células endorreduplicadas;

▼M7

— relação dose-resposta, quando possível de determinar;

— análises estatísticas e respetivos métodos;

— dados que comprovem a exposição da medula óssea;

— dados relativos aos controlos negativo e positivo realizados em paralelo com o ensaio, com as respetivas gamas, valores médios e desvios-padrão;

— dados históricos relativos aos controlos negativo e positivo, indicando intervalos, médias e desvios-padrão e limites de controlo de 95 % para a distribuição, bem como o período abrangido e o número de observações;

— critérios cumpridos para uma resposta positiva ou negativa.

Discussão dos resultados.

Conclusão.

Referências.

REFERÊNCIAS

1) OCDE (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OCDE, Paris.

2) Adler, I.D. (1984), «Cytogenetic Tests in Mammals» in Mutagenicity Testing: A Practical Approach, Venittand, S., J.M. Parry (eds.), IRL Press, Washington, DC, pp. 275-306.

3) Preston, R.J. *et al*. (1987), Mammalian *in vivo* cytogenetic assays. Analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells, Mutation Research, Vol. 189/2, pp. 157-165.

4) Richold, M. *et al*. (1990), «In Vivo Cytogenetics Assays» in Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 115-141.

5) Tice, R.R. *et al*. (1994), Report from the working group on the *in vivo* mammalian bone marrow chromosomal aberration test, Mutation Research, Vol. 312/3, pp. 305-312.

6) Adler, I.D. *et al*. (1998), Recommendations for statistical designs of *in vivo* mutagenicity tests with regard to subsequent statistical analysis, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 417/1, pp. 19-30.

7) Ryan, T.P. (2000), Statistical Methods for Quality Improvement, 2nd ed., John Wiley and Sons, New York.

8) Hayashi, M. *et al*. (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 723/2, pp. 87-90.

9) Hayashi, M. *et al*. (1994), *in vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay, Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects, Vol. 312/3, pp. 293-304.

10) Fielder, R.J. *et al*. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group. Dose setting in *in vivo* mutagenicity assays, Mutagenesis, Vol. 7/5, pp. 313-319.

▼**M7**

11) OCDE (2000), «Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation» OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, N.º19, OECD Publishing, Paris.

12) Pacchierotti, F., V. Stocchi (2013), Analysis of chromosome aberrations in somatic and germ cells of the mouse, Methods in Molecular Biology, Vol. 1044, pp. 147-163.

13) Lovell, D.P. *et al*. (1989), «Statistical Analysis of *in vivo* Cytogenetic Assays» in Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS SubCommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 184-232.

▼**M7**

Apêndice 1

DEFINIÇÕES

Aneuploidia: desvio do número diploide (ou haploide) normal de cromossomas, cifrando-se a diferença em um ou mais cromossomas mas não em múltiplos de séries completas de cromossomas (*cf.* poliploidia).

Centrómero: região ou regiões de um cromossoma a que estão associadas fibras fusiformes durante a divisão celular, permitindo o movimento ordeiro dos cromossomas para os polos da célula.

Produto químico: substância ou mistura.

Aberração cromatídica: lesão estrutural de um cromossoma, expressa pela rutura de cromatídeos em isolado ou pela rutura de cromatídeos seguida da sua união.

Aberração cromossómica: lesão estrutural de um cromossoma, expressa pela rutura de ambos os cromatídeos no mesmo local ou pela sua rutura seguida de união.

Endorreduplicação: processo mediante o qual, após um período S de replicação do ADN, o núcleo não sofre mitose mas inicia um novo período S. O resultado são cromossomas com cromatídeos em número de 4, 8, 16, etc.

Lacuna: lesão acromática de extensão inferior à largura de um cromatídeo e com desalinhamento mínimo dos cromatídeos.

Índice mitótico: relação entre o número de células em mitose e o número total de células de uma população, que constitui uma medida do estado de proliferação dessa população celular.

Aberração numérica: alteração do número de cromossomas, relativamente ao número de cromossomas característico dos animais utilizados (aneuploidia).

Poliploidia: aberração cromossómica numérica que implica uma alteração no número de cromossomas no seu conjunto — por oposição a uma alteração numérica numa parte do conjunto dos cromossomas (*cf.* aneuploidia).

Aberração cromossomática estrutural: alteração da estrutura dos cromossomas detetável por exame microscópico das células em metáfase, na forma de supressões e fragmentos e de alterações num cromatídeo ou entre cromatídeos.

Produto químico em estudo: qualquer substância ou mistura à qual se aplique o presente método de ensaio.

▼M7

Apêndice 2

CONCEÇÃO MULTIFATORIAL PARA IDENTIFICAR DIFERENÇAS ENTRE SEXOS NO ENSAIO DE ABERRAÇÕES CROMOSSÓMICAS *IN VIVO*

Conceção multifatorial e sua análise

Este ensaio utiliza, no mínimo, 5 machos e 5 fêmeas para cada concentração, totalizando, no mínimo, 40 animais (20 machos e 20 fêmeas, além dos controlos positivos pertinentes).

O ensaio, que constitui uma das conceções multifatoriais mais simples, equivale a uma análise de variância bidirecional, em que o sexo e a concentração são os principais efeitos. Os dados podem ser analisadas por vários pacotes de *software* estatístico normalizados, como SPSS, SAS, STATA e Genstat, bem como por recurso ao parâmetro R.

A análise discrimina, no conjunto de dados, a variabilidade entre os sexos, a variabilidade entre as concentrações e a variabilidade relativa à interação entre os sexos e as concentrações. Cada um dos termos é testado em função da variabilidade entre os animais replicados nos grupos do mesmo sexo, para a mesma concentração. Em muitos manuais de estatística normalizados (ver referências) e na função «ajuda» que acompanha os pacotes estatísticos, estão disponíveis dados pormenorizados sobre a metodologia em causa.

A análise consiste em confrontar o termo da interação sexo-concentração no quadro ANOVA ([1]). Na ausência de um termo de interação significativo, os valores combinados entre os sexos ou entre as concentrações proporcionam provas estatísticas válidas entre as concentrações, com base nas que são agrupadas no termo de variabilidade dos grupos ANOVA.

A análise prossegue repartindo a estimativa da variabilidade entre as concentrações por contrastes, o que proporciona uma melhor abordagem dos contrastes lineares e quadráticos das respostas às concentrações. Quando existe uma interação significativa sexo-concentração, este termo pode igualmente ser cindido em contraste de interação linear em função do sexo e em contraste de interação quadrática em função do sexo. Ambos os termos em causa permitem definir se as respostas às concentrações são paralelas para ambos os sexos ou se existe uma resposta diferencial entre eles.

A estimativa do agrupamento no contexto da variabilidade do grupo pode ser utilizada como teste par-a-par da diferença entre as médias. As comparações podem ser efetuadas entre as médias para ambos os sexos e as médias para a concentração diferente, bem como entre as concentrações do controlo negativo. Casos exista uma interação significativa, podem efetuar-se comparações entre as médias de várias concentrações, com um só sexo, ou entre as médias dos sexos para a mesma concentração.

REFERÊNCIAS

Há muitos manuais de estatística que abordam a teoria, a conceção, a metodologia, a análise e a interpretação de abordagens fatoriais, desde a forma mais simples (bifatorial) às formas mais complexas utilizadas na metodologia de ensaio. Apresenta-se a seguir uma lista não exaustiva. Algumas publicações fornecem exemplos concretos de abordagens comparáveis, incluindo, por vezes, o código para efetuar as análises por recurso a vários pacotes de *software*.

([1]) Os estatistas que adotam uma metodologia de modelização como os modelos lineares gerais (GLM) podem abordar a análise de uma forma diferente mas comparável, independentemente do quadro ANOVA tradicional, que recorre, para os cálculos estatísticos, a abordagens algorítmicas da era pré-informática.

▼**M7**

Box, G.E.P, Hunter, W.G. and Hunter, J.S. (1978). Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building. New York: John Wiley & Sons.

Box G.E.P. & Draper, N.R. (1987). Empirical model-building and response surfaces. John Wiley & Sons Inc.

Doncaster, C.P. & Davey, A.J.H. (2007). Analysis of Variance and Covariance: How to Choose and Construct Models for the Life Sciences. Cambridge University Press.

Mead, R. (1990). The Design of Experiments. Statistical principles for practical application. Cambridge University Press.

Montgomery D.C. (1997). Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons Inc.

Winer, B.J. (1971). Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill.

Wu, C.F.J & Hamada, M.S. (2009). Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc.

▼M7

B.12. ENSAIO DE MICRONÚCLEOS EM ERITRÓCITOS DE MAMÍFEROS

INTRODUÇÃO

Este método de ensaio é equivalente ao *Test Guideline* 474 (2016) da OCDE. Faz parte de uma série de métodos de ensaio sobre toxicologia genética. Está disponível um documento da OCDE que fornece informações sucintas sobre ensaios de toxicologia genética e resume as alterações recentemente efetuadas às orientações da OCDE nesse domínio (1).

O ensaio *in vivo* de micronúcleos em células de mamíferos é particularmente importante para a avaliação da genotoxicidade, visto que, embora possam variar de espécie para espécie, os fatores do metabolismo *in vivo*, a farmacocinética e os processos de reparação do ADN estão ativos e contribuem para as respostas. Os ensaios *in vivo* são igualmente úteis para investigação suplementar de genotoxicidade detetada *in vitro*.

O ensaio *in vivo* de micronúcleos em células de mamíferos é utilizado na deteção de danos induzidos pelo produto químico em estudo nos cromossomas ou no aparelho mitótico dos eritroblastos, através da avaliação da formação de micronúcleos em eritrócitos colhidos na medula óssea ou provenientes de células de sangue periférico de animais, geralmente roedores.

O objetivo do ensaio de micronúcleos é identificar produtos químicos que causem danos citogenéticos indutores da formação de micronúcleos que contenham cromossomas inteiros ou fragmentos de cromossoma retardatários.

Quando um eritroblasto de medula óssea evolui para um eritrócito imaturo (também designado por «eritrócito policromático» ou «reticulócito»), o núcleo principal é expulso, mas os micronúcleos eventualmente já formados podem permanecer no citoplasma. A visualização ou deteção dos micronúcleos nestas células é facilitada pela ausência de núcleo principal. Um aumento da frequência de eritrócitos imaturos micronucleados nos animais expostos ao produto químico em estudo constitui uma indicação de aberrações cromossómicas estruturais, ou numéricas, induzidas.

Identificam-se e quantificam-se os eritrócitos micronucleados recém-formados por coloração, seguida de contagem visual ao microscópio ou análise automática. O recurso a meios de contagem automática facilita grandemente a contagem de um número suficiente de eritrócitos imaturos no sangue periférico ou na medula óssea de animais adultos. O recurso a meios automáticos constitui uma alternativa aceitável à avaliação não-automática (2). Os estudos comparativos realizados revelaram que os métodos automáticos, associados à utilização de padrões de calibração adequados, podem proporcionar melhores sensibilidade, reprodutibilidade interlaboratorial e reprodutibilidade intralaboratorial do que a contagem não-automática ao microscópio (3) (4). Entre os sistemas automáticos que podem medir frequências de eritrócitos micronucleados contam-se os citómetros de fluxo (5), analisadores de imagem (6) (7) e citómetros de varrimento por laser (8).

Embora isso não faça normalmente parte do ensaio, vários critérios permitem distinguir entre fragmentos de cromossoma e cromossomas inteiros. É o caso da identificação da presença ou ausência de cinetócoro ou de ADN centromérico, ambos característicos dos cromossomas intactos. A ausência de cinetócoro ou de ADN centromérico indica que o micronúcleo contém apenas fragmentos de cromossomas; a presença de algum deles indica perda cromossómica.

O apêndice 1 estabelece definições da terminologia utilizada.

▼M7

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Uma vez que os eritrócitos são produzidos na medula óssea, o tecido-alvo dos danos genéticos avaliados neste ensaio é medula óssea de roedores adultos jovens. Desde que se apresentem razões científicas para isso, pode igualmente realizar-se a contagem de micronúcleos em eritrócitos imaturos de sangue periférico de outras espécies de mamíferos, cuja sensibilidade na deteção de produtos químicos causadores de aberrações cromossómicas estruturais ou numéricas tenha sido demonstrado ser adequada (por indução de micronúcleos em eritrócitos imaturos). A frequência dos eritrócitos imaturos micronucleados é o parâmetro principal. Se os animais forem expostos ao produto químico em estudo de forma contínua durante um período superior ao tempo de vida dos eritrócitos da espécie em causa (por exemplo, no caso do rato, quatro ou mais semanas), a frequência de eritrócitos maduros micronucleados no sangue periférico pode igualmente utilizar-se como parâmetro em espécies sem grande seleção esplénica contra células micronucleadas.

Se houver provas de que nem o produto ou os produtos químicos em estudo nem nenhum dos seus metabolitos entram em contacto com o tecido-alvo, o presente ensaio pode não ser adequado.

Antes da aplicação deste método de ensaio a uma mistura para obter dados relacionados com exigências normativas, importa ponderar se — e, em caso afirmativo, por que motivo — o método pode fornecer resultados adequados para o efeito. Essa ponderação não é necessária se exigências normativas impuserem o ensaio da mistura em causa.

PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

Expõem-se os animais ao produto químico em estudo, por uma via adequada. Se for utilizada medula óssea, eutanasiam-se os animais transcorrido(s) o(s) período(s) adequado(s) após a exposição e extrai-se-lhes medula; em seguida, realizam-se as preparações e procede-se à sua coloração (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15). Se for utilizado sangue periférico, colhe-se o sangue uma vez transcorrido(s) o(s) período(s) adequado(s) após a exposição; em seguida, realizam-se as preparações e procede-se à sua coloração (12) (16) (17) (18). Se a administração do produto químico for rápida, é importante colher o sangue ou a medula óssea depois de transcorrido um período suficiente para possibilitar a deteção de eritrócitos imaturos com micronucleação induzida pela exposição. Se forem colhidas amostras de sangue periférico, é necessário que tenha passado um período suficiente para que os efeitos se manifestem na circulação sanguínea. Pesquisam-se os micronúcleos nas preparações por exame ao microscópio, análise de imagem, citometria de fluxo ou citometria de varrimento por laser.

VERIFICAÇÃO DA COMPETÊNCIA TÉCNICA DO LABORATÓRIO

Determinação da competência técnica

A fim de comprovar que possui experiência suficiente na realização do ensaio antes de passar a utilizar este método em ensaios de rotina, o laboratório deve ter-se demonstrado capaz de reproduzir os resultados de frequência de micronúcleos decorrentes dos dados publicados (por exemplo: (17) (19) (20) (21) (22)) com, pelo menos, dois produtos químicos de controlo positivo (incluindo respostas fracas induzidas por doses baixas desses produtos químicos), nomeadamente os constantes do quadro 1, e com amostras de controlo do excipiente/do solvente compatíveis (ver o ponto 26). Estas experiências devem utilizar doses que originem aumentos reprodutíveis e dependentes da dose e devem demonstrar a sensibilidade e a gama dinâmica do sistema de ensaio no tecido em causa (medula óssea ou sangue periférico), recorrendo ao método de contagem a utilizar no laboratório. Este requisito não é aplicável a laboratórios com experiência, isto é, que disponham de uma base de dados históricos, como se refere nos pontos 14 a 18.

Dados históricos de controlo

No decurso da determinação da competência técnica, o laboratório deve estabelecer:

— um historial da gama e da distribuição dos controlos positivos;

▼M7

— um historial da gama e da distribuição dos controlos negativos.

Ao obter os primeiros dados para um historial de distribuição dos controlos negativos, os controlos negativos realizados em paralelo devem ser coerentes com os dados de controlo publicados, caso existam. À medida que se forem adicionando mais dados experimentais ao historial de distribuição dos controlos, os controlos negativos realizados em paralelo devem, idealmente, situar-se dentro dos limites de 95 % dos controlos daquela distribuição. A base de dados históricos de controlo negativo do laboratório deve ter a solidez estatística necessária para que o laboratório possa avaliar a distribuição dos seus dados de controlo negativo. A bibliografia indica que podem ser necessárias, no mínimo, 10 experiências, embora, de preferência, devam ser realizadas, pelo menos, 20 experiências em condições experimentais comparáveis. Os laboratórios devem utilizar métodos de controlo de qualidade, como gráficos de controlo (por exemplo: gráficos C ou gráficos de barras (23)), para identificar a variabilidade dos seus dados e demonstrar que o laboratório domina a metodologia. Encontram-se na bibliografia (24) outras recomendações sobre a forma de obter e utilizar dados históricos (critérios de inclusão e exclusão de dados em séries históricas e critérios de aceitação das experiências realizadas).

Se o laboratório não realizar um número suficiente de experiências para estabelecer uma distribuição estatisticamente sólida dos controlos negativos (ver o ponto 15) durante a determinação da competência técnica (ponto 13), é aceitável que a distribuição possa ser completada nos primeiros ensaios de rotina. Este procedimento deve seguir as recomendações enunciadas na bibliografia (24); os resultados de controlo negativo obtidos nas referidas experiências devem ser coerentes com os dados de controlo negativo publicados.

As eventuais alterações ao protocolo experimental devem ser ponderadas em função da manutenção da coerência dos dados delas resultantes com a base de dados históricos de controlo do laboratório. Apenas grandes incoerências justificam a constituição de uma nova base de dados históricos de controlo, caso um parecer de perito considere que a nova distribuição diferirá da anterior (ver o ponto 15). Durante a constituição da nova base, pode não ser necessário dispor de uma base de dados de controlo negativo completa para realizar ensaios reais, desde que o laboratório possa demonstrar que os valores de controlo negativo obtidos em paralelo são coerentes com a sua base de dados anterior ou com os dados publicados correspondentes.

Os dados de controlo negativo devem ser constituídos pela incidência de eritrócitos imaturos micronucleados em cada animal. Os controlos negativos realizados em paralelo devem, idealmente, situar-se dentro dos limites de 95 % dos controlos da distribuição da base de dados históricos de controlo negativo do laboratório. Caso se situem fora desses limites, os dados de controlos negativos realizados em paralelo podem ser aceitáveis para inclusão no historial de distribuição de controlos se não forem valores aberrantes extremos, se o sistema de ensaio estiver comprovadamente dominado (ver o ponto 15) e se não houver indícios de erro humano ou de deficiência técnica.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Preparativos

Escolha da espécie animal

Devem ser utilizados animais adultos, jovens e saudáveis, das estirpes de laboratório mais comuns. Podem ser utilizados ratos, ratazanas ou qualquer outra espécie de mamífero adequada. Caso se utilize sangue periférico, deve comprovar-se que a eliminação, pelo baço, de células micronucleadas em circulação não compromete a deteção de micronúcleos induzidos na espécie escolhida, o que foi claramente demonstrado em relação ao sangue periférico dos ratos e

▼M7

ratazanas (2). Deve constar do relatório a justificação científica da utilização de uma espécie que não seja o rato ou a ratazana. Se forem utilizadas espécies que não sejam roedores, recomenda-se que a medição dos micronúcleos induzidos seja integrada noutro ensaio de toxicidade adequado.

Condições de alojamento e de alimentação dos animais

No caso dos roedores, a temperatura do biotério deve ser de 22 °C (± 3 °C). Idealmente, a humidade relativa deve estar compreendida entre 50 % e 60 %, embora sejam aceitáveis valores compreendidos entre 40 %, no mínimo, e um valor máximo que, preferencialmente, não deve exceder 70 %, salvo durante os períodos de limpeza do biotério. A iluminação deve ser artificial, com uma alternância de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão. Para a alimentação, podem ser usadas dietas convencionais de laboratório, com acesso ilimitado a água potável. Quando o produto químico em estudo for administrado por via alimentar, a escolha da dieta pode ser condicionada pela necessidade de assegurar uma incorporação adequada. Os roedores devem ser alojados em pequenos grupos (não mais de cinco por gaiola) do mesmo sexo e grupo de exposição — caso não se prevejam comportamentos agressivos –, de preferência em gaiolas com pavimento contínuo e enriquecimento ambiental adequado, embora possam ser alojados individualmente se houver razões científicas que o justifiquem.

Preparação dos animais

Normalmente utilizam-se animais adultos, jovens e saudáveis (no caso dos roedores, idealmente com 6-10 semanas no início da exposição, embora sejam aceitáveis animais ligeiramente mais velhos), que se distribuem aleatoriamente pelos grupos de controlo e pelos grupos de exposição. Identificam-se os animais de forma unívoca, utilizando um método que não cause sofrimento e seja o menos invasivo possível (por exemplo: anilhas, marcações, *microchips* ou identificação biométrica, mas não entalhe de orelhas nem amputação de falanges), e aclimatam-se às condições do laboratório durante, pelo menos, cinco dias. As gaiolas devem estar dispostas de forma a minimizar possíveis efeitos derivados do seu posicionamento. Devem ser evitadas contaminações cruzadas pelo produto químico de controlo positivo e pelo produto químico em estudo. No início do estudo, a diferença de peso entre os animais deve ser mínima e não deve exceder ± 20 % do peso médio de cada sexo.

Preparação das doses

Os produtos químicos em estudo que se apresentem no estado sólido devem ser dissolvidos ou suspensos em solventes ou excipientes adequados, ou misturados na dieta ou na água de beber, antes da administração aos animais. Os produtos químicos em estudo que se apresentem no estado líquido podem ser administrados diretamente ou ser diluídos antes da administração. No caso de exposições por inalação, os produtos químicos em estudo podem ser administrados sob a forma de gás, vapor ou aerossol sólido/líquido, em função das suas propriedades físico-químicas. Devem ser utilizadas preparações frescas do produto químico em estudo, a menos que os dados de estabilidade demonstrem que o mesmo pode ser armazenado e definam as condições de armazenagem adequadas.

Condições de realização do ensaio

Solvente/excipiente

O solvente/excipiente não deve produzir efeitos tóxicos nas doses utilizadas nem reagir quimicamente com o produto químico em estudo. A eventual utilização de solventes/excipientes menos habituais deve ser fundamentada por dados de referência que indiquem serem compatíveis. Recomenda-se, sempre que possível, a utilização prioritária de solventes/excipientes aquosos. A água, o soro fisiológico, uma solução de metilcelulose, uma solução de sal de sódio de carboximetilcelulose, o azeite e o óleo de milho constituem exemplos de solventes/excipientes compatíveis de utilização comum. Na ausência de dados de controlo, históricos ou publicados, demonstrativos de que o solvente/excipiente inabitual eventualmente escolhido não induz a formação de micronúcleos nem outros efeitos deletérios, deve realizar-se um ensaio preliminar que permita tirar conclusões sobre a aceitabilidade do controlo do solvente/excipiente utilizado.

▼M7

Controlos

Controlos positivos

Como regra geral, deve incluir-se em cada ensaio um grupo de animais expostos a um produto químico de controlo positivo. Este princípio pode não ser seguido caso o laboratório de ensaio se tenha demonstrado competente na realização do ensaio e tenha estabelecido um gama histórica de controlo positivo. Se não se incluir um grupo de controlo positivo paralelo, cada ensaio deve compreender controlos de contagem (lâminas fixadas e não-coradas ou amostras de suspensões celulares, conforme o método de contagem utilizado). Para o efeito, podem incluir-se na contagem realizada no estudo amostras de referência adequadas, provenientes de experiências de controlo positivo efetuadas separadamente a intervalos regulares (por exemplo todos os 6 a 18 meses) e armazenadas em seguida — por exemplo obtidas nos ensaios de demonstração de competência técnica e, subsequentemente, com a regularidade necessária.

Os produtos químicos de controlo positivo devem gerar, com fiabilidade, um aumento detetável da frequência de formação de micronúcleos, em relação ao nível de ocorrência espontâneo. Quando se recorre a microscopia para efetuar uma contagem não-automática, a dose de controlo positivo a administrar deve ser escolhida de modo a evidenciar efeitos claros, mas não imediatamente reveladores da identidade das amostras codificadas à pessoa que efetua as contagens. É aceitável administrar o controlo positivo por via diferente da utilizada para o produto químico em estudo, seguir um programa de exposição diferente e colher amostras uma única vez. Quando se justifique, pode ainda ponderar-se a utilização de produtos químicos de controlo positivo da mesma classe química. O quadro 1 apresenta exemplos de produtos químicos de controlo positivo.

Quadro 1

Exemplos de produtos químicos de controlo positivo.

Produto químico e n.º de registo CAS
Metanossulfonato de etilo [62-50-0]
Metanossulfonato de metilo [66-27-3]
Etilnitrosoureia [759-73-9]
Mitomicina C [50-07-7]
Ciclofosfamida (mono-hidratada) [50-18-0 (6055-19-2)]
Trietilenomelamina [51-18-3]
Colquicina [64-86-8] ou vimblastina [865-21-4] — como aneugénios

Controlos negativos

A todos os tempos de colheita de amostras deve estar associado um grupo de animais de controlo negativo, tratados da mesma forma que os animais dos grupos expostos, exceto não serem expostos ao produto químico em estudo. Se for utilizado um solvente/excipiente para administrar o produto químico em estudo, o grupo de controlo deve recebê-lo também. No entanto, se os dados históricos de controlo negativo do laboratório de ensaio demonstrarem, para cada tempo de colheita de amostras, coerência na variabilidade entre animais e na frequência de células com micronúcleos, pode ser suficiente uma única amostragem de controlo negativo. Em caso de recurso a uma única amostragem de controlo negativo, esta deve corresponder ao primeiro tempo de colheita de amostras utilizado no estudo.

▼M7

Se for utilizado sangue periférico e o estudo for de curta duração, uma amostra colhida antes da exposição pode fazer as vezes de amostra de controlo negativo ensaiada em paralelo, desde que os dados daí resultantes sejam coerentes com a base de dados históricos de controlo do laboratório de ensaio. Foi demonstrado na ratazana que a colheita de pequenos volumes (por exemplo menos de 100 µl/dia) de amostras antes da exposição tem incidência mínima na frequência de fundo da formação de micronúcleos (25)

PROTOCOLO DE ENSAIO

Número e sexo dos animais

Em geral, a resposta dos animais, em termos de formação de micronúcleos em machos e fêmeas, é semelhante, pelo que a maioria dos estudos pode ser realizada em qualquer dos sexos (26). Dados reveladores de diferenças significativas entre machos e fêmeas (por exemplo: diferenças de toxicidade sistémica, de metabolismo, de biodisponibilidade, de toxicidade para a medula óssea etc., designadamente em estudos exploratórios de gamas de dosagem) aconselham a utilização de ambos os sexos. Neste caso, pode justificar-se o estudo em ambos os sexos: por exemplo no contexto de um estudo de toxicidade com repetição da dose. Caso se utilizem animais de ambos os sexos, pode justificar-se o recurso ao modelo fatorial. O apêndice 2 explica como analisar os dados por recurso a este modelo.

A dimensão dos grupos no início do estudo deve permitir dispor de um mínimo de 5 animais analisáveis do mesmo sexo por grupo ou, se forem utilizados ambos os sexos, de um mínimo de 5 animais analisáveis de cada sexo por grupo. Nos casos em que a exposição humana ao produto químico possa ser específica de um dos sexos, como acontece com alguns produtos farmacêuticos, o ensaio deve ser executado com animais do sexo em causa. A título de orientação, o número máximo de animais necessário num estudo em medula óssea realizado de acordo com os parâmetros estabelecidos no ponto 37, com três grupos de dosagem e, em paralelo, um grupo de controlo negativo e um grupo de controlo positivo (cada um deles constituído por cinco animais do mesmo sexo), será normalmente de 25 a 35.

Níveis de dosagem

Se, por não estarem disponíveis dados que possam servir de orientação na escolha das doses, se realizar previamente um estudo exploratório da gama de dosagens a administrar, este deve ter lugar no mesmo laboratório, utilizando a mesma espécie, a mesma estirpe, o mesmo sexo e o mesmo regime de exposição previstos para o estudo principal (27). Este estudo deve procurar identificar a dose máxima tolerável (DMT), definida como a dose mais elevada que será tolerada sem gerar sinais de toxicidade limitativos do estudo, atendendo à duração do mesmo (por exemplo: que induza quebras do peso corporal ou citotoxicidade no sistema hematopoiético, mas que não cause morte nem sinais de dor, sofrimento ou tensão que obriguem a eutanasiar os animais (28)).

A dose máxima pode igualmente ser definida como a dose que gera toxicidade na medula óssea (por exemplo: redução de mais de 50 % da proporção de eritrócitos imaturos no total de eritrócitos da medula óssea ou do sangue periférico, mas sem que essa proporção se reduza a menos de 20 % do valor correspondente ao grupo de controlo). Todavia, quando se analisam células com reação positiva à CD71 na circulação sanguínea periférica (por citometria de fluxo), esta fração de eritrócitos imaturos muito jovens responde a ações tóxicas mais rapidamente do que o grupo, mais numeroso, de eritrócitos imaturos com reação positiva ao ARN. Por conseguinte, nas experiências que, após exposição aguda, examinem a fração de eritrócitos imaturos com reação positiva à CD71, a toxicidade pode parecer superior à revelada em experiências que identifiquem os eritrócitos imaturos com base no teor de ARN. Por este motivo, nas experiências que prevejam cinco ou menos dias de exposição, pode definir-se o nível máximo de dosagem de um produto químico tóxico como a dose que provoca uma redução com significância estatística da proporção de eritrócitos imaturos com reação positiva à CD71 no total de eritrócitos, mas sem que essa proporção se reduza a menos de 5 % do valor correspondente ao grupo de controlo (29).

▼M7

Os produtos químicos cujas propriedades toxicocinéticas atinjam a saturação ou que induzam processos de desintoxicação passíveis de se traduzirem numa diminuição da exposição após administração prolongada podem constituir exceção aos critérios de fixação das doses, devendo ser avaliados caso a caso.

Um estudo completo que vise obter informação sobre a resposta às doses deve incluir um grupo de controlo negativo e, no mínimo, três níveis de dosagem, espaçados por um fator que, em geral, é 2 e não pode ser superior a 4. Se o produto químico em estudo não gerar toxicidade num estudo exploratório da gama de dosagens ou os dados disponíveis o comprovarem, a dose mais elevada deve ser de 1 000 mg/kg de peso corporal/dia, para períodos de administração de 14 ou mais dias, ou de 2 000 mg/kg de peso corporal/dia, para períodos de administração de menos de 14 dias. Se o produto químico em estudo gerar toxicidade, a dose máxima administrada deve ser a DMT e as doses utilizadas devem, de preferência, abranger uma gama compreendida entre a dose máxima e uma dose de toxicidade baixa ou nula. Caso se observe toxicidade no tecido-alvo (medula óssea) a todas as doses ensaiadas, recomenda-se a realização de um estudo complementar com doses não-tóxicas. Os estudos destinados a obter informações quantitativas dose-resposta mais precisas podem necessitar de mais grupos de dosagem. Os limites indicados podem variar no caso do estudo de certos tipos de produtos químicos (por exemplo medicamentos para uso humano) abrangidos por exigências específicas.

Ensaio do limite

Se os estudos exploratórios da gama de dosagens ou dados existentes relativos a estirpes animais afins indicarem que um regime de exposição, pelo menos, à dose-limite (abaixo indicada) não gera efeitos tóxicos observáveis (nomeadamente inibição de proliferação na medula óssea ou outros sinais de citotoxicidade no tecido-alvo) e, com base em estudos de genotoxicidade *in vitro* ou em dados referentes a produtos químicos estruturalmente afins, não for de prever a ocorrência de genotoxicidade, pode não ser necessário um estudo completo com três níveis de dosagem, desde que tenha sido demonstrado que o(s) produto(s) químico(s) em estudo atinge(m) o tecido-alvo (medula óssea). Nesses casos, pode ser suficiente um nível de dosagem único, correspondente à dose-limite. Se a administração se prolongar por 14 dias ou mais, a dose-limite é de 1 000 mg/kg de peso corporal/dia. Se o período de administração for inferior a 14 dias, a dose-limite é de 2 000 mg/kg de peso corporal/dia.

Administração das doses

Na conceção do ensaio, deve ter-se em conta a via prevista de exposição humana. Por conseguinte, desde que devidamente justificadas, podem escolher-se vias de exposição como a alimentação, a água de beber, as vias tópica, subcutânea ou intravenosa, a via oral (por sonda gástrica), a via inalatória ou a via intratraqueal, ou o recurso a implantes. A via escolhida deve garantir a exposição adequada do(s) tecido(s)-alvo. A injeção intraperitoneal não é, em geral, recomendada, uma vez que não se trata de uma via previsível de exposição humana, só devendo utilizar-se com justificação científica específica. Se o produto químico em estudo for misturado nos alimentos ou na água de beber, especialmente no caso de uma dose única, deve ter-se o cuidado de prever, entre o consumo dos alimentos e da água e a colheita de amostras, um intervalo suficiente para permitir a deteção dos efeitos (ver o ponto 37). O volume máximo de líquido que se pode administrar de cada vez por sonda gástrica ou injeção depende do tamanho do animal, não devendo normalmente exceder 1 ml/100 g de peso corporal; excetuam-se as soluções aquosas, que podem ser administradas na proporção de 2 ml/100 g de peso corporal. A utilização de volumes superiores carece de justificação. Exceto no caso de produtos químicos irritantes ou corrosivos, que normalmente produziriam efeitos exacerbados a concentrações superiores, a variabilidade do volume de ensaio deve ser minimizada ajustando a concentração, de modo a garantir a administração de um volume constante relativamente à massa corporal, a todos os níveis de dosagem.

▼M7

Programa de exposição

De preferência, realizam-se duas ou mais exposições, intervaladas de 24 horas, sobretudo quando o ensaio se integra noutros estudos de toxicidade. Em alternativa, caso haja razões científicas para isso (por exemplo no caso dos produtos químicos que reconhecidamente bloqueiam o ciclo celular), pode efetuar-se uma exposição única. Para facilitar a administração de grandes volumes, os produtos químicos em estudo também podem ser administrados sob a forma de uma dose dividida (ou seja, duas ou mais exposições no mesmo dia, separadas por não mais de 2 a 3 horas). Nesses casos, ou no caso da administração do produto químico em estudo por inalação, a colheita das amostras deve ser programada em função do momento da última administração ou do termo da exposição.

O ensaio pode ser realizado em ratos ou ratazanas de um dos seguintes modos:

a. Expõem-se uma única vez os animais ao produto químico em estudo. Colhem-se amostras de medula óssea pelo menos duas vezes (em grupos de animais independentes), a primeira das quais pelo menos 24 horas, mas não mais de 48 horas, após a exposição, respeitando um intervalo adequado (ou intervalos adequados) entre as colheitas, a menos que o produto químico em estudo tenha reconhecidamente uma meia-vida excecionalmente longa. Uma eventual colheita de amostras menos de 24 horas após a exposição carece de justificação. Colhem-se amostras de sangue periférico pelo menos duas vezes (no mesmo grupo de animais), a primeira das quais pelo menos 36 horas, mas não mais de 72 horas, após a exposição, respeitando um intervalo adequado (ou intervalos adequados) entre as colheitas. A primeira colheita de amostras para análise deve abranger todos os grupos de dosagem; contudo, as colheitas posteriores de amostras só têm de incidir na dosagem mais elevada. Quando se detetar uma resposta positiva numa determinada colheita, não será preciso voltar a efetuar colheitas de amostras, a menos que seja necessário obter informações quantitativas dose-resposta. Os tempos, acima referidos, a respeitar até às colheitas de amostras decorrem da cinética de aparecimento e desaparecimento dos micronúcleos nos dois tipos de tecidos.

b. Caso se realizem duas exposições em dias sucessivos (por exemplo duas exposições intervaladas de 24 horas), devem ser colhidas amostras, uma vez, 18 a 24 horas após a exposição final, no caso da medula óssea, ou, uma vez, 36 a 48 horas após a exposição final, no caso do sangue periférico (30). Estes tempos a respeitar até às colheitas de amostras decorrem da cinética de aparecimento e desaparecimento dos micronúcleos nestes dois tipos de tecidos.

c. Caso se realizem três ou mais exposições em dias sucessivos (por exemplo três ou mais exposições intervaladas de aproximadamente 24 horas), as amostras devem ser colhidas não mais de 24 horas após a última exposição, no caso da medula óssea, e não mais de 40 horas após a última exposição, no caso do sangue periférico (31). Esta programação de exposição permite combinar o ensaio dos cometas (colheita das amostras 2 a 6 horas após a última exposição, por exemplo) com o ensaio dos micronúcleos e integrar este último em estudos de toxicidade com repetição da dose. Segundo os dados disponíveis, após 3 ou mais administrações é observável indução da formação de micronúcleos nestes períodos mais amplos (15).

Se necessário e cientificamente justificado, e para facilitar a combinação com outros ensaios de toxicidade, podem ser adotados outros regimes de dosagem ou de colheita de amostras.

Exames

Os animais em estudo devem ser sujeitos a exames clínicos gerais, registando-se os sinais clínicos detetados, pelo menos uma vez por dia, de preferência à(s) mesma(s) hora(s) todos os dias e tendo em consideração o período de pico dos efeitos previstos após a exposição. Pelo menos duas vezes por dia, durante o período de exposição, verificam-se os casos de morbidez ou mortalidade no conjunto dos animais. Todos os animais devem ser pesados no início do estudo, pelo menos uma vez por semana (em estudos com repetição da dose) e quando forem eutanasiados. Nos estudos que se prolonguem por uma semana ou mais, o

▼M7

consumo de alimentos deve ser medido, pelo menos, uma vez por semana. Se o produto químico em estudo for administrado através da água de beber, o consumo desta deve ser medido a cada mudança de água e, pelo menos, uma vez por semana. Os animais com indicadores não-letais de toxicidade excessiva devem ser eutanasiados antes do termo do período de ensaio (28). Em determinados casos, pode monitorizar-se a temperatura corporal dos animais, dado que estados de hipertermia ou de hipotermia induzidos pela exposição ao produto químico em estudo podem falsear os resultados (32) (33) (34).

Exposição dos tecidos-alvo

Sempre que isso se justifique e nos casos em que não haja outros dados de exposição (ver o ponto 48), deve colher-se uma amostra de sangue num ou mais momentos oportunos, para se poderem determinar os níveis dos produtos químicos em estudo no plasma e assim comprovar que ocorreu exposição da medula óssea.

Preparação da medula óssea/do sangue

As células da medula óssea são normalmente colhidas nos fémures ou nas tíbias dos animais imediatamente após a eutanásia. Geralmente, colhem-se, preparam-se e coram-se as células por métodos bem definidos. Para se obterem pequenos volumes de sangue periférico respeitando as normas aplicáveis de bem-estar animal, pode recorrer-se a um método que permita a sobrevivência do animal, como a colheita na veia caudal ou noutro vaso sanguíneo adequado, ou optar-se por realizar a colheita num vaso principal ou por punção cardíaca, depois de eutanasiar o animal. Tanto no caso dos eritrócitos provenientes de medula óssea como no caso dos eritrócitos provenientes de sangue periférico, e conforme o método de análise utilizado, pode efetuar-se imediatamente uma coloração supravital das células (16) (17) (18), proceder-se à preparação de esfregaços das mesmas, que são em seguida corados para análise microscópica, ou optar-se por fixar e corar as células de modo adequado a uma análise por citometria de fluxo. A utilização de um corante específico do ADN — por exemplo: laranja de acridina (35) ou uma combinação do corante 33258 da Hoechst e de pironina-Y (36) — pode eliminar alguns erros associados à utilização de corantes inespecíficos do ADN. Esta vantagem não exclui a utilização de corantes convencionais (por exemplo o Giemsa para análise microscópica). Podem igualmente ser utilizados outros sistemas — por exemplo colunas de celulose para remoção das células nucleadas (37) (38) –, desde que comprovadamente compatíveis com a preparação laboratorial das amostras.

Caso sejam aplicáveis, podem ser utilizados anticorpos anticinetócoro (39), o método FISH com sondas de ADN pancentromérico (40) ou a marcação *in situ* com iniciadores pancentroméricos específicos, em combinação com uma coloração de contraste adequada do ADN (41), para identificar a natureza dos micronúcleos (cromossomas inteiros ou fragmentos de cromossomas), a fim de determinar se o mecanismo indutor da formação de micronúcleos resulta de atividade clastogénica e/ou aneugénica. Na diferenciação entre clastogénios e aneugénios, podem ser utilizados outros métodos, cuja eficácia tenha sido demonstrada.

Análise (automática e não-automática)

Todas as lâminas ou amostras a analisar, incluindo as dos grupos de controlo positivo e negativo, devem ser codificadas individualmente e de forma aleatória antes de qualquer análise, para que a pessoa que efetua as contagens não fique a par dos níveis de exposição. Essa codificação é desnecessária quando se utilizam sistemas de contagem automáticos, que não se baseiam num exame visual, influenciável pelo operador. Determina-se a proporção de eritrócitos imaturos no total de eritrócitos (imaturos + maturos) para cada animal através da contagem de, pelo menos, 500 eritrócitos, no caso da medula óssea, ou 2 000 eritrócitos, no caso do sangue periférico (42). A incidência de eritrócitos imaturos micronucleados deve ser determinada examinando, pelo menos, 4 000 eritrócitos imaturos por animal (43). Se a base de dados históricos de controlo negativo do laboratório indicar que a frequência média de fundo de eritrócitos imaturos micronucleados é inferior a 0,1 %, deve ponderar-se o exame de células adicionais. Nas amostras analisadas, a proporção de eritrócitos imaturos no total de eritrócitos, nos animais expostos, não deve ser inferior a 20 % da proporção verificada no grupo de

▼M7

controlo do excipiente/solvente, numa contagem ao microscópio, nem inferior a aproximadamente 5 % da proporção verificada no grupo de controlo do excipiente/solvente, numa contagem por métodos citométricos dos eritrócitos imaturos com reação positiva à CD71 (ver o ponto 31) (29). Por exemplo, no caso de um ensaio de medula óssea com contagem por microscopia, se a proporção de eritrócitos imaturos na medula óssea do grupo de controlo for de 50 %, o limite superior de toxicidade será de 10 % de eritrócitos imaturos.

Dado que o baço da ratazana retém e destrói os eritrócitos micronucleados, é preferível restringir a análise de eritrócitos imaturos micronucleados à fração mais jovem, para garantir uma sensibilidade elevada ao analisar sangue periférico desta espécie. Quando se recorre a métodos de análise automáticos, é possível identificar esses eritrócitos mais imaturos com base no teor elevado de ARN dos mesmos ou no elevado nível de recetores da transferina (reação positiva à CD71) expressos à superfície dos ditos (31). Porém, a comparação direta de vários métodos de coloração revelou que podem ser obtidos resultados satisfatórios por diversos métodos, nomeadamente pela coloração clássica com laranja de acridina (3) (4).

DADOS E RELATÓRIOS

Tratamento dos resultados

Devem ser apresentados num quadro os dados relativos a cada animal. Devem ser indicados separadamente, para cada animal examinado, o número de eritrócitos imaturos, o número de eritrócitos imaturos micronucleados e a proporção de eritrócitos imaturos no total de eritrócitos. Se se tiverem exposto ratos ao produto químico em estudo continuamente durante quatro semanas ou mais, também devem ser indicados os dados eventualmente obtidos relativamente ao número e à proporção de eritrócitos maturos micronucleados. Devem também ser indicados dados relativos à toxicidade revelada nos animais e aos sinais clínicos neles evidenciados.

Critérios de aceitabilidade

Critérios para determinar a aceitabilidade do ensaio:

a. Os dados relativos ao grupo de controlo negativo ensaiado em paralelo são considerados aceitáveis para inclusão na base de dados históricos de controlo do laboratório (ver os pontos 15 a 18);

b. Os grupos de controlo positivo ou de controlo de contagem ensaiados em paralelo induzem respostas compatíveis com as incluídas na base de dados históricos de controlo positivo e geram um aumento com significância estatística relativamente ao grupo de controlo negativo ensaiado em paralelo (ver os pontos 24 a 25);

c. Foi analisado um número adequado de doses e de células;

d. Os critérios de seleção da dose mais elevada são coerentes com os descritos nos pontos 30 a 33.

Avaliação e interpretação dos resultados

Se forem cumpridos todos os critérios de aceitabilidade, o produto químico em estudo é considerado inequivocamente positivo se:

a. Pelo menos um dos grupos de exposição apresentar aumento, com significância estatística, da frequência de eritrócitos imaturos micronucleados, em relação ao grupo de controlo negativo ensaiado em paralelo;

b. Esse aumento, avaliado por recurso a uma análise de tendências adequada, for dependente da dose no período correspondente a, pelo menos, um dos tempos de colheita de amostras; e

c. Nenhum destes resultados estiver fora da distribuição dos dados históricos de controlo negativo (por exemplo limites de 95 % dos controlos, com base numa distribuição de Poisson).

▼M7

Se, ao se colherem amostras uma vez transcorrido um período determinado para o efeito, apenas se examinar a dose mais elevada, o produto químico em estudo é considerado inequivocamente positivo caso se verifique aumento, com significância estatística, em relação ao grupo de controlo negativo ensaiado em paralelo e os resultados correspondentes se situem fora da distribuição dos dados históricos de controlo negativo (por exemplo: limites de 95 % dos controlos, com base numa distribuição de Poisson). As referências bibliográficas (44) (45) (46) (47) contêm recomendações sobre os métodos estatísticos mais adequados. Quando se estuda a resposta à dosagem, devem ser analisados, pelo menos, três grupos expostos a doses diferentes do produto químico em estudo. A unidade experimental dos testes estatísticos deve ser o animal. Um resultado positivo no ensaio de micronúcleos indica que o produto químico em estudo induz a formação de micronúcleos, como resultado de danos provocados nos cromossomas ou no aparelho mitótico dos eritroblastos da espécie ensaiada. Caso se tenha realizado um ensaio de deteção de centrómeros em micronúcleos, considerar-se-ão aneugénicos os produtos químicos que produzam micronúcleos com centrómeros (deteção de ADN centromérico ou de cinetócoro, indicativos de perda cromossómica total).

Se forem cumpridos todos os critérios de aceitabilidade, o produto químico em estudo é considerado inequivocamente negativo se, em todas as condições experimentais examinadas:

a. Nenhum dos grupos de exposição apresentar aumento, com significância estatística, da frequência de eritrócitos imaturos micronucleados, em relação ao grupo de controlo negativo ensaiado em paralelo;

b. Não se observar nenhum aumento dependente da dose, numa avaliação feita com base numa análise de tendências adequada, para nenhum tempo de amostragem;

c. Todos os resultados se situarem dentro da distribuição dos dados históricos de controlo negativo (por exemplo: limites de 95 % dos controlos, com base numa distribuição de Poisson); e

d. A medula óssea tiver sido exposta ao(s) produto(s) químico(s) em estudo.

As referências bibliográficas (44) (45) (46) (47) contêm recomendações sobre os métodos estatísticos mais adequados. A exposição da medula óssea ao produto químico em estudo pode ser comprovada por uma redução da razão entre os eritrócitos imaturos e os eritrócitos maturos ou por medição dos níveis do produto químico em estudo no plasma ou no sangue. No caso da administração intravenosa, não são necessárias provas da exposição. Em alternativa, para demonstrar a exposição da medula óssea, pode recorrer-se a dados de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) obtidos num estudo independente, pela mesma via e na mesma espécie. Um resultado negativo indica que, nas condições do ensaio, o produto químico em estudo não induz a formação de micronúcleos em eritrócitos imaturos da espécie ensaiada.

As respostas inequivocamente positivas ou inequivocamente negativas não carecem de confirmação.

No caso de a resposta não ser inequivocamente negativa nem inequivocamente positiva, para se tirarem conclusões sobre a importância biológica de um resultado (por exemplo um aumento ténue ou no limite), os dados devem ser avaliados por peritos e/ou as experiências realizadas devem ser objeto de estudos complementares. Em alguns casos, pode ser útil analisar mais células ou repetir o ensaio, alterando as condições experimentais.

Em certos casos, raros, mesmo após estudos complementares, os dados obtidos não permitirão concluir por um resultado positivo ou negativo do ensaio do produto químico, pelo que se considerará que o resultado do estudo é ambíguo.

Relatório do ensaio

Elementos a constar do relatório do ensaio:

Resumo

Produto químico em estudo:

— origem, número de lote e data-limite de utilização, se forem conhecidos;

▼**M7**

— estabilidade, se for conhecida.

Substância monocomponente:

— aspeto físico, hidrossolubilidade e outras propriedades físico-químicas relevantes;

— dados de identificação química, como as denominações IUPAC ou CAS, o número CAS, o código SMILES ou InChI, a fórmula estrutural, o grau de pureza, a identidade química das impurezas, se justificado e exequível, etc.

Substância multicomponentes, UVCB e misturas:

— caracterização, tanto quanto possível, pela identidade química (ver acima), pela ocorrência quantitativa e pelas propriedades físico-químicas relevantes dos componentes.

Preparação do produto químico em estudo:

— justificação do excipiente escolhido;

— solubilidade e estabilidade do produto químico em estudo no solvente/excipiente, se forem conhecidas;

— preparação de fórmulas alimentares, na água de beber ou inaláveis;

— determinações analíticas realizadas (eventualmente) a essas fórmulas (por exemplo: estabilidade, homogeneidade, concentrações nominais).

Animais ensaiados:

— espécie/estirpe utilizada e justificação da utilização;

— número, idade e sexo;

— origem, condições de alojamento, dieta etc.;

— método de identificação unívoca dos animais;

— em estudos de curta duração: peso de cada animal no início e no final do ensaio; em estudos de duração superior a uma semana: peso corporal de cada animal durante o estudo e consumo de alimentos; devem incluir-se, para cada grupo, a gama de pesos corporais, com a média e o desvio-padrão respetivos.

Condições de realização do ensaio:

— dados de controlo positivo e de controlo negativo (excipiente/solvente);

— resultados do eventual estudo exploratório da gama de dosagem;

— fundamentação da escolha das doses;

— elementos relativos à preparação do produto químico em estudo;

— elementos relativos à administração do produto químico em estudo;

— fundamentação da via e do período de administração;

— métodos para verificar se os produtos químicos em estudo entraram na circulação geral ou atingiram o tecido-alvo;

▼M7

— dose real (mg/kg de peso corporal/dia), calculada a partir da concentração do produto químico em estudo nos alimentos/na água de beber (ppm) e do consumo de alimentos/de água de beber, se aplicável;

— elementos relativos à qualidade dos alimentos e da água;

— método de eutanásia;

— eventual método de analgesia;

— descrição detalhada da exposição e do programa de colheita de amostras e justificação das escolhas feitas;

— métodos de preparação das lâminas;

— procedimentos para o isolamento e a conservação das amostras;

— métodos de medição da toxicidade;

— critérios de contabilização dos eritrócitos imaturos micronucleados;

— número de células analisadas por animal para determinar a frequência de eritrócitos imaturos micronucleados e a proporção de eritrócitos imaturos em relação aos eritrócitos maturos;

— critérios de aceitabilidade do estudo;

— métodos (como a utilização de anticorpos anticinetócoro ou de sondas específicas de ADN centromérico) para determinar se os micronúcleos contêm cromossomas inteiros ou fragmentos de cromossomas, se aplicável;

Resultados:

— estado dos animais antes e durante o período de ensaio, incluindo sinais de toxicidade;

— proporção de eritrócitos imaturos em relação ao total de eritrócitos;

— número de eritrócitos imaturos micronucleados correspondente a cada animal;

— média e desvio-padrão dos eritrócitos imaturos micronucleados correspondentes a cada grupo;

— relação dose-resposta, se possível;

— métodos estatísticos utilizados e análises estatísticas efetuadas;

— dados relativos aos grupos de controlo negativo e de controlo positivo ensaiados em paralelo, indicando os intervalos, valores médios e desvios-padrão correspondentes;

— dados históricos relativos ao controlo negativo e ao controlo positivo, indicando os intervalos, valores médios e desvios-padrão correspondentes e os limites de 95 % dos controlos da distribuição, bem como o período abrangido e o número de pontos de dados;

— dados comprovativos da exposição da medula óssea;

— dados de caracterização indicativos da presença, nos micronúcleos, de cromossomas inteiros ou de fragmentos de cromossomas, se aplicável;

— critérios de resposta positiva ou negativa cumpridos.

▼**M7**

Discussão dos resultados.

Conclusão.

Referências.

REFERÊNCIAS

1) OCDE (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234. OCDE, Paris.

2) Hayashi, M., *et al.* (2007). *In vivo* erythrocyte micronucleus assay. III. Validation and regulatory acceptance of automated scoring and the use of rat peripheral blood reticulocytes, with discussion of non-hematopoietic target cells and a single dose-level limit test. *Mutation Research — Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, vol. 627/1, pp. 10-30.

3) MacGregor, J.T., *et al.* (2006). Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: II. An efficient method of monitoring chromosomal damage in the rat. *Toxicology Sciences*, vol. 94/1, pp. 92-107.

4) Dertinger, S.D., *et al.* (2006). Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: I. Intra- and interlaboratory comparison with microscopic scoring. *Toxicological Sciences*, vol. 94/1, pp. 83-91.

5) Dertinger, S.D., *et al.* (2011). Flow cytometric scoring of micronucleated erythrocytes: an efficient platform for assessing *in vivo* cytogenetic damage. *Mutagenesis*, vol. 26/1, pp. 139-145.

6) Parton, J.W., Hoffman, W.P., Garriott, M.L. (1996). Validation of an automated image analysis micronucleus scoring system. *Mutation Research*, vol. 370/1, pp. 65-73.

7) Asano, N., *et al.* (1998). An automated new technique for scoring the rodent micronucleus assay: computerized image analysis of acridine orange supravitally stained peripheral blood cells. *Mutation Research — Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, vol. 404/1-2, pp. 149-154.

8) Styles, J.A., *et al.* (2001). Automation of mouse micronucleus genotoxicity assay by laser scanning cytometry. *Cytometry*, vol. 44/2, pp. 153-155.

9) Heddle, J.A. (1973). A rapid *in vivo* test for chromosomal damage, *Mutation Research — Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, vol. 18/2, pp. 187-190.

10) Schmid, W. (1975). The micronucleus test. *Mutation Research*, vol. 31/1, pp. 9-15.

11) Heddle, J.A., *et al.* (1983). The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Research — Reviews in Genetic Toxicology*, vol. 123/1, pp. 61-118.

12) Mavournin, K.H., *et al.* (1990). The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Research — Reviews in Genetic Toxicology*, vol. 239/1, pp. 29-80.

13) MacGregor, J.T., *et al.* (1983). Micronuclei in circulating erythrocytes: a rapid screen for chromosomal damage during routine toxicity testing in mice. *Developments in Toxicology Environmental Science*, vol. 11, pp. 555-558.

▼M7

14) MacGregor, J.T., *et al.* (1987). Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. *Mutation Research — Genetic Toxicology*, vol. 189/2, pp. 103-112.

15) MacGregor, J.T., *et al.* (1990). The *in vivo* erythrocyte micronucleus test: measurement at steady state increases assay efficiency and permits integration with toxicity studies. *Fundamental and Applied Toxicology*, vol. 14/3, pp. 513-522.

16) Hayashi, M., *et al.* (1990). The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutation Research — Genetic Toxicology*, vol. 245/4, pp. 245-249.

17) CSGMT/JEMS.MMS — The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (1992). Micronucleus test with mouse peripheral blood erythrocytes by acridine orange supravital staining: the summary report of the 5th collaborative study. *Mutation Research — Genetic Toxicology*, vol. 278/2-3, pp. 83-98.

18) CSGMT/JEMS.MMS — The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan (1995). Protocol recommended by the CSGMT/JEMS.MMS for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test. The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT) (CSGMT/JEMS.MMS, The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan). *Mutagenesis*, vol. 10/3, pp. 153-159.

19) Salamone, M.F., Mavournin, K.H. (1994). Bone marrow micronucleus assay: a review of the mouse stocks used and their published mean spontaneous micronucleus frequencies. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, vol. 23/4, pp. 239-273.

20) Krishna, G., Urda, G., Paulissen, J. (2000). Historical vehicle and positive control micronucleus data in mice and rats. *Mutation Research — Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, vol. 453/1, pp. 45-50.

21) Hayes, J., *et al.* (2009). The rat bone marrow micronucleus test-study design and statistical power. *Mutagenesis*, vol. 24/5, pp. 419-424.

22) Wakata, A., *et al.* (1998). Evaluation of the rat micronucleus test with bone marrow and peripheral blood: summary of the 9th collaborative study by CSGMT/JEMS.MMS. Collaborative Study Group for the Micronucleus Test. Environmental Mutagen Society of Japan, Mammalian Mutagenicity Study Group. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, vol. 32/1, pp. 84-100.

23) Ryan, T.P. (2000). Statistical Methods for Quality Improvement. 2.ª edição. John Wiley and Sons, Nova Iorque.

24) Hayashi, M., *et al.* (2011). Compilation and use of genetic toxicity historical control data. *Mutation Research — Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, vol. 723/2, pp. 87-90.

25) Rothfuss, A., *et al.* (2011). Improvement of *in vivo* genotoxicity assessment: combination of acute tests and integration into standard toxicity testing. *Mutation Research — Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, vol. 723/2, pp. 108-120.

26) Hayashi, M., *et al.* (1994). *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. *Mutation Research — Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, vol. 312/3, pp. 293-304.

27) Fielder, R.J., *et al.* (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group. Dose setting in *in vivo* mutagenicity assays. *Mutagenesis*, vol. 7/5, pp. 313-319.

▼M7

28) OCDE (2000). «Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation» OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS). Series on Testing and Assessment, N^{o} 19. OECD Publishing, Paris.

29) LeBaron, M.J., *et al.* (2013). Influence of counting methodology on erythrocyte ratios in the mouse micronucleus test. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, vol. 54/3, pp. 222-228.

30) Higashikuni, N., Sutou, S. (1995). An optimal, generalized sampling time of 30 +/– 6 h after double dosing in the mouse peripheral blood micronucleus test. *Mutagenesis*, vol. 10/4, pp. 313-319.

31) Hayashi, M., *et al.* (2000). *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, vol. 35/3, pp. 234-252.

32) Asanami, S., Shimono, K. (1997). High body temperature induces micronuclei in mouse bone marrow. *Mutation Research — Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, vol. 390/1-2, pp. 79-83.

33) Asanami, S., Shimono, K., Kaneda, S. (1998). Transient hypothermia induces micronuclei in mice. *Mutation Research — Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, vol. 413/1, pp. 7-14.

34) Spencer, P.J., *et al.* (2007). Induction of micronuclei by phenol in the mouse bone marrow: I. Association with chemically induced hypothermia. *Toxicological Sciences*, vol. 97/1, pp. 120-127.

35) Hayashi, M., Sofuni, T., Ishidate, M. Jr. (1983). An application of Acridine Orange fluorescent staining to the micronucleus test. *Mutation Research Letters*, vol. 120/4, pp. 241-247.

36) MacGregor, J.T., Wehr, C.M., Langlois, R.G. (1983). A simple fluorescent staining procedure for micronuclei and RNA in erythrocytes using Hoechst 33258 and pyronin Y. *Mutation Research*, vol. 120/4, pp. 269-275.

37) Romagna, F., Staniforth, C.D. (1989). The automated bone marrow micronucleus test. *Mutation Research — Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, vol. 213/1, pp. 91-104.

38) Sun, J.T., Armstrong, M.J., Galloway, S.M. (1999). Rapid method for improving slide quality in the bone marrow micronucleus assay; an adapted cellulose column procedure. *Mutation Research*, vol. 439/1, pp. 121-126.

39) Miller, B.M., Adler, I.D. (1990). Application of antikinetochore antibody staining (CREST staining) to micronuclei in erythrocytes induced *in vivo*. *Mutagenesis*, vol. 5/4, pp. 411-415.

40) Miller, B.M., *et al.* (1991). Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to in situ hybridization with biotinylated gamma satellite DNA. *Mutagenesis*, vol. 6/4, pp. 297-302.

41) Russo, A. (2002). PRINS tandem labeling of satellite DNA in the study of chromosome damage. *American Journal of Medical Genetics*, vol. 107/2, pp. 99-104.

42) Gollapudi, B.B., McFadden, L.G. (1995). Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test. *Mutation Research*, vol. 347/2, pp. 97-99.

43) OCDE (2014). Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines. OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS). Series on Testing and Assessment, No. 198. OECD Publishing, Paris.

▼**M7**

44) Richold, M., *et al.* (1990). «In Vivo Cytogenetics Assays» *in* Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Parte I, revista. Kirkland, D.J. (editores), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 115-141.

45) Lovell, D.P., *et al.* (1989). «Statistical Analysis of *in vivo* Cytogenetic Assays» *in* Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Parte III. Kirkland, D.J. (editores), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 184-232.

46) Hayashi, M., *et al.* (1994). Statistical analysis of data in mutagenicity assays: rodent micronucleus assay. *Environmental Health Perspectives*, vol. 102/Suppl. 1, pp. 49-52.

47) Kim, B.S., Cho, M., Kim, H.J. (2000). Statistical analysis of *in vivo* rodent micronucleus assay. *Mutation Research — Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, vol. 469/2, pp. 233-241.

▼M7

Apêndice 1

DEFINIÇÕES

Centrómero: Região ou regiões de um cromossoma às quais se ligam as fibras fusiformes durante a divisão celular, permitindo o movimento organizado dos cromossomas-filhos para os polos das células-filhas.

Produto químico: Substância ou mistura.

Eritroblasto: Estádio inicial do desenvolvimento dos eritrócitos, imediatamente anterior à formação do eritrócito imaturo, durante o qual a célula ainda possui um núcleo.

Cinetócoro: Estrutura proteica que se forma no centrómero das células eucarióticas, que liga o cromossoma a polímeros microtubulares do fuso mitótico durante a mitose e a meiose e que separa os cromatídeos do mesmo cromossoma durante a divisão celular.

Micronúcleo: Pequeno núcleo separado do núcleo principal da célula e que se adiciona a este, formado durante a telófase da mitose ou meiose por cromossomas inteiros ou fragmentos de cromossoma retardatários.

Eritrócito normocromático ou maturo: Eritrócito totalmente maturo, que perdeu o ARN residual presente depois da enucleação e/ou outros marcadores celulares de vida curta que geralmente desaparecem a seguir à enucleação, depois da divisão final do eritroblasto.

Eritrócito policromático ou imaturo: Eritrócito recém-formado, num estádio intermédio de desenvolvimento, que é corado tanto pelo componente azul como pelo componente vermelho dos corantes sanguíneos clássicos, como o corante combinado de Wright-Giemsa, devido à presença de ARN residual na célula recém-formada. Estas células recém-formadas são praticamente idênticas aos reticulócitos, observáveis por meio de um corante vital que faz o ARN residual aglutinar-se num retículo. Atualmente, utilizam-se muitas vezes outros métodos para identificar eritrócitos recém-formados, como a coloração monocromática do ARN com corantes fluorescentes ou a marcação de marcadores superficiais de vida curta, como a CD71, com anticorpos fluorescentes. Os eritrócitos policromáticos, os reticulócitos e os eritrócitos com reação positiva à CD71 são todos eles eritrócitos imaturos, embora corresponda a cada um deles uma distribuição etária ligeiramente diferente.

Reticulócito: Eritrócito recém-formado que é corado por um corante vital que faz o ARN residual aglutinar-se num retículo característico. A distribuição etária dos reticulócitos e dos eritrócitos policromáticos é semelhante.

Produto químico em estudo: Qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado este método de ensaio.

▼M7

Apêndice 2

MODELO FATORIAL PARA IDENTIFICAR DIFERENÇAS ENTRE SEXOS NO ENSAIO *IN VIVO* DE MICRONÚCLEOS

Modelo fatorial e sua análise

Neste modelo são ensaiados, no mínimo, 5 machos e 5 fêmeas a cada concentração, totalizando, no mínimo, 40 animais (20 machos e 20 fêmeas, além dos controlos positivos necessários).

Este modelo, que constitui um dos modelos fatoriais mais simples, equivale a uma análise de variância bidirecional em que o sexo e a concentração são os efeitos principais. Os dados podem ser analisados por vários pacotes de *software* estatístico correntes, como o SPSS, o SAS, o STATA e o Genstat, bem como por recurso à linguagem R.

A análise discrimina, no conjunto de dados, a variabilidade entre os sexos, a variabilidade entre as concentrações e a variabilidade ligada à interação entre os sexos e as concentrações. Cada um destes termos é comparado com uma estimativa da variabilidade entre os animais replicados nos grupos do mesmo sexo expostos à mesma concentração. Em muitos manuais de estatística (ver «Referências»), bem como na função «ajuda» dos pacotes estatísticos, encontram-se disponíveis dados pormenorizados da metodologia em causa.

Analisa-se em seguida o termo da interação sexo-concentração num quadro ANOVA ([1]). Na ausência de um termo de interação significativo, a combinação dos valores correspondentes aos sexos ou aos níveis de concentração permite realizar testes estatísticos válidos entre os níveis, com base no termo de variabilidade intragrupo combinada resultante da ANOVA.

A análise prossegue repartindo a estimativa da variabilidade entre as concentrações por contrastes, o que permite testar os contrastes lineares e quadráticos das respostas às concentrações. Quando há interação significativa sexo-concentração, este termo pode igualmente ser repartido num contraste de interação linear em função do sexo e num contraste de interação quadrática em função do sexo. Estes termos permitem verificar se as respostas às concentrações são paralelas para os dois sexos ou se a resposta difere de um sexo para o outro.

A estimativa da variabilidade intragrupo combinada pode servir para testar par-a-par diferenças entre médias. Estas comparações podem ser efetuadas entre as médias correspondentes a cada um dos sexos e entre as médias correspondentes a concentrações diferentes (comparações com os níveis dos controlos negativos, por exemplo). Caso haja interação significativa, podem efetuar-se comparações entre as médias correspondentes a várias concentrações para um dos sexos ou entre as médias dos dois sexos para a mesma concentração.

Referências

Há muitos manuais de estatística que abordam a teoria, a modelação, a metodologia, a análise e a interpretação de modelos fatoriais, que vão desde a forma mais simples (bifatorial) às formas mais complexas utilizadas na metodologia descrita em «*Design of Experiments*». Apresenta-se a seguir uma lista não-exaustiva. Algumas publicações dão exemplos concretos de modelos comparáveis, incluindo, por vezes, o código para efetuar as análises por recurso a vários pacotes de *software*.

([1]) Os estatísticos que adotem uma metodologia de modelização como a dos modelos lineares gerais (GLM) podem realizar esta análise de uma forma diferente, embora comparável, sem utilizarem necessariamente o quadro ANOVA tradicional, que recorre, para os cálculos estatísticos, a métodos algorítmicos da era pré-informática.

▼**M7**

Box, G.E.P, Hunter, W.G., Hunter, J.S. (1978). Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building. Nova Iorque, John Wiley & Sons.

Box, G.E.P., Draper, N.R. (1987). Empirical model-building and response surfaces. John Wiley & Sons Inc.

Doncaster, C.P., Davey, A.J.H. (2007). Analysis of Variance and Covariance: How to Choose and Construct Models for the Life Sciences. Cambridge University Press.

Mead, R. (1990). The Design of Experiments. Statistical principles for practical application. Cambridge University Press.

Montgomery, D.C. (1997). Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons Inc.

Winer, B.J. (1971). Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill.

Wu, C.F.J, Hamada, M.S. (2009). Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc.

▼B

B.13./14. **MUTAGENICIDADE — ENSAIO DE MUTAÇÃO REVERSA EM BACTÉRIAS**

1. **MÉTODO**

O presente método é idêntico ao método OCDE TG 471 — Ensaio de mutação reversa bacteriana (1997).

1.1. INTRODUÇÃO

O ensaio de mutação reversa bacteriana utiliza estirpes de *Salmonelas typhimurium* e *Escherichia coli* carentes em aminoácidos para detectar mutações pontuais, causadas pela substituição, adição ou supressão de um ou mais pares de bases do ADN (1) (2) (3). O princípio do presente ensaio de mutação reversa bacteriana é a detecção de mutações que invertem as mutações existentes nas estirpes de ensaio, restaurando a capacidade funcional das bactérias sintetizarem um ácido essencial. As bactérias com mutação reversa são detectadas pela sua capacidade de crescimento na ausência do aminoácido em que as estirpes de ensaio eram carentes.

As mutações pontuais causam diversas doenças genéticas humanas, existindo provas substanciais de que as mutações pontuais em oncogenes e em genes supressores de tumores nas células somáticas estão envolvidas na formação de tumores nos seres humanos e em animais experimentais. O ensaio de mutação reversa bacteriana é rápido, barato e de relativamente fácil execução. Muitas das estirpes de ensaio têm diversas características que as tornam mais sensíveis para a detecção de mutações, nomeadamente sequências de ADN identificativas dos locais de inversão, aumento da permeabilidade celular a grandes moléculas e eliminação ou aumento da ocorrência de erros nos processos de reparação do ADN. A especificidade das estirpes de ensaio pode fornecer alguma informação útil sobre os tipos de mutações induzidos pelos agentes genotóxicos. Já existe uma grande base de dados com resultados respeitantes a uma vasta gama de ensaios de mutação reversa bacteriana, tendo sido desenvolvidas metodologias com características bem conhecidas e que utilizam produtos químicos com diferentes propriedades físico-químicas, nomeadamente compostos temporários.

Ver também a parte B da Introdução Geral.

1.2. DEFINIÇÕES

Ensaio de mutação reversa com *Salmonelas typhimurium* ou *Escherichia coli*: detecta mutações em estirpes carentes num determinado aminoácido (histidina ou triptofano, respectivamente), que tem como resultado a produção de uma estirpe independente do abastecimento externo desse aminoácido.

Mutagéneos de substituição de um par de bases são os agentes que causam uma alteração das bases do ADN. No ensaio de mutação reversa essa alteração pode ocorrer no local da mutação original ou num local diferente do genoma bacteriano.

Mutagéneos por deslocação do quadro de leitura são agentes que causam a adição ou supressão de um ou mais pares de bases no ADN, modificando dessa forma o quadro de leitura do ARN.

▼B

1.3. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O ensaio de mutação reversa bacteriana utiliza células procariotas, que diferem das células de mamífero em características como a absorção, metabolismo, estrutura dos cromossomas e processos de reparação do ADN. Os ensaios conduzidos *in vitro* exigem geralmente a utilização de uma fonte exógena de activação metabólica. Os sistemas de activação metabólica *in vitro* não reproduzem inteiramente as condições *in vivo* nos mamíferos. O ensaio não fornece, por conseguinte, informação directa sobre a potência mutagénica e carcinogénica da substância nos mamíferos.

O ensaio de mutação reversa bacteriana é geralmente utilizado para a despistagem inicial da actividade genotóxica e, nomeadamente, para detectar a indução de mutações pontuais. Uma extensa base de dados demonstrou que muitos produtos químicos que dão resultados positivos no presente ensaio apresentam uma actividade mutagénica noutros ensaios. Há exemplos de agentes mutagénicos que não são detectados pelo presente ensaio, podendo as razões para essas falhas ser atribuídas à natureza específica do ponto final detectado, a diferenças na activação metabólica ou ainda a diferenças na biodisponibilidade. Por outro lado, elementos que aumentem a sensibilidade do ensaio de mutação reversa bacteriana podem conduzir à sobrestimação da actividade mutagénica.

O ensaio de mutação reversa bacteriana pode não ser apropriado para a avaliação de certas classes de produtos químicos, nomeadamente compostos altamente bactericidas (por exemplo, certos antibióticos) e produtos que se pensa (ou que se sabe) que interferem especificamente com o sistema de replicação das células de mamíferos (por exemplo, alguns inibidores da topoisomerase e alguns compostos análogos a nucleosídeos). Nesses casos, poderá ser mais apropriado utilizar ensaios de mutação em células de mamíferos.

Embora muitos dos compostos que dão resultados positivos no presente ensaio sejam carcinogéneos para os mamíferos, essa correlação não é absoluta. Com efeito, a correlação depende da classe química e, por outro lado, alguns agentes carcinogéneos não são detectados no ensaio pelo facto de o seu mecanismo ou mecanismos de actuação, não genotóxicos, não afectarem as células bacterianas.

1.4. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

As suspensões bacterianas são expostas à substância em estudo tanto na presença como na ausência de um sistema de activação metabólico exógeno. No método de incorporação em placas, as suspensões são misturadas num revestimento de gelose e depois vertidas na superfície duma lâmina de gelose com meio mínimo. No método com incubação prévia, a mistura de tratamento é incubada e só depois misturada com uma cobertura de gelose e preparada em placas com meio mínimo. Independentemente da técnica que tenha sido utilizada, as colónias com mutação reversa são contadas e comparadas com o número de colónias com mutação reversa espontânea em placas de controlo com solvente, após dois ou três dias de incubação.

Estão descritos diversos procedimentos para executar o ensaio de mutação reversa bacteriana. Entre os mais geralmente utilizados estão o método de incorporação em placas (1) (2) (3) (4), o método com incubação prévia (2) (3) (5) (6) (7) (8), o método em flutuação (9) (10) e o método em suspensão (11). As adaptações necessárias para os ensaios de gases ou vapores também se encontram descritas (12).

▼B

Os procedimentos descritos no presente método dizem principalmente respeito aos métodos de incorporação em placas e com incubação prévia. Qualquer dos dois é aceitável para a realização de experiências na presença e na ausência de um sistema de activação metabólica. Algumas substâncias poderão ser detectadas de forma mais eficaz utilizando o método com incubação prévia. Essas substâncias pertencem a classes químicas que incluem as nitrosaminas alifáticas de cadeia curta, os metais, os aldeídos, os corantes azóicos e compostos diazócios, os alcalóides de priolizidina, os compostos alílicos e os compostos nitro (3). Por outro lado, certas classes de mutagéneos nem sempre são detectadas quando se utilizam os procedimentos padrão, tais como o método de incorporação em placas ou o método com incubação prévia. Esses casos são considerados «especiais» e recomenda-se fortemente que sejam utilizados procedimentos alternativos para a sua detecção. Estão já identificados os seguintes casos «especiais» (e exemplos dos procedimentos que podem ser utilizados para a sua detecção): corantes azóicos e compostos diazóticos (3) (5) (6) (13), gases e compostos químicos (12) (14) (15) (16) e glicósidos (17) (18) voláteis. Qualquer desvio do procedimento padrão terá de ser cientificamente justificado.

1.5. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.5.1. **Preparação**

1.5.1.1. *Bactérias*

Devem ser utilizadas culturas frescas de bactérias na fase final do crescimento exponencial ou no início da fase estacionária (aproximadamente 10^9 células/ml). Não devem ser utilizadas culturas em fase estacionária adiantada. É essencial que as culturas utilizadas na experiência contenham um título elevado de células viáveis, que pode ser demonstrado por dados históricos de controlo sobre as curvas de crescimento ou durante o próprio ensaio, através da determinação das células viáveis em placas.

A temperatura de incubação recomendada é de 37°C.

Devem ser utilizadas pelo menos cinco estirpes das bactérias, entre as quais quatro estirpes de *S. typhimurium* (TA1535; TA1537 ou TA97 ou TA 97a; TA98 e TA100) para as quais foi demonstrado que são fiáveis e dão resultados reprodutíveis entre laboratórios. Essas quatro estirpes de *S. typhimurium* têm um par com as bases GC no local da inversão primária e sabe-se que não permitem detectar certos agentes mutagéneos oxidantes, de ligação cruzada nem hidrazinas. Essas substâncias podem ser detectadas utilizando as estirpes *E. coli* WP2 ou *S. typhimurium* TA102 (19) que têm um par com as bases AT no local da inversão primária. Por conseguinte, a combinação de estirpes recomendada é:

— *S. typhimurium* TA1535, e

— *S. typhimurium* TA1537 ou TA97 ou TA97a, e

— *S. typhimurium* TA98, e

— *S. typhimurium* TA 100, e

— *E. coli* WP2 uvrA, ou *E. coli* WP2 uvrA (pKM101), ou *S. typhimurium* TA102.

Para a detecção de agentes mutagéneos causadores de ligações cruzadas, poderá ser preferível incluir a estirpe TA102 ou acrescentar uma estirpe capaz de reparar o ADN de *E. coli* [por exemplo, *E. coli* WP2 ou *E. coli* WP2 (pKM101)].

▼B

Devem ser utilizados os procedimentos estabelecidos para a preparação de culturas de arranque, verificação dos mercadores e armazenamento. As quantidades de aminoácidos necessários para o crescimento (histidina para as estirpes de *S. typhimurium* e triptofano para as estirpes de *E. coli*) devem ser demonstradas para cada preparação de cultura de arranque conservada. Outras características fenotípicas devem também ser verificadas, a saber: a presença ou ausência de plasmídeos de Factor-r, quando necessário [ou seja, resistência à ampicilina nas estirpes TA98, TA100 e TA97 ou TA97a, WP2 uvrA e WP2 uvrA (pKM101) e resistência à ampicilina e à tetraciclina na estirpe TA102]; presença de mutações características (ou seja, mutação rfa em *S. typhimurium,* através da sensibilização com violeta de cristal, e mutação uvrA em *E. coli* ou mutação uvrB em S. *typhimurium,* através da sensibilização com raios ultravioleta) (2) (3). As estirpes devem ainda apresentar, de forma espontânea, contagens de mutações reversas nas gamas de frequência esperadas em função dos dados históricos de controlo do laboratório e também, de preferência, da literatura.

1.5.1.2. *Meio*

Será utilizado um meio mímimo de gelose apropriado (por exemplo, contendo meio mínimo Vogel-Bonner E e glucose) e uma cobertura de gelose com histidina e biotina ou triptofano para permitir alguma divisão celular (1) (2) (9).

1.5.1.3. *Activação metabólica*

As bactérias devem ser expostas à substância em estudo tanto na presença como na ausência de um sistema adequado de activação metabólica. O sistema mais geralmente utilizado é uma fracção pós-mitocondrial reforçada com co-factor (S9) preparada a partir de fígados de roedores tratados com agentes de indução enzimática, como por exemplo Aroclor 1254 (1) (2) ou uma mistura de fenobarbitona e β-naftoflavona (18) (20) (21). A fracção pós-mitocondrial é geralmente utilizada em concentrações na gama de 5 % a 30 % v/v na mistura S9. A escolha e o estado do sistema de activação metabólico podem depender da classe dos produtos químicos em estudo. Em alguns casos pode revelar-se adequado utilizar várias concentrações diferentes de fracção pós-mitocondrial. Para os corantes azóicos para os compostos diazóicos, poderá ser mais indicado um sistema activação metabólica redutor (6) (13).

1.5.1.4. *Substância em estudo/preparação*

As substâncias sólidas devem ser dissolvidas ou suspensas em solventes ou veículos adequados e, se necessário, diluídas antes da exposição das bactérias. As substâncias líquidas podem ser adicionadas directamente aos sistemas em estudo e/ou diluídas antes de serem adicionadas às células. Devem ser utilizadas preparações frescas da substância em estudo, a menos que os dados de estabilidade demonstrem que o respectivo armazenamento não coloca problemas para o ensaio.

O solvente/veículo não deve reagir com a substância em estudo, devendo ser compatível com a sobrevivência das células e com a actividade da mistura S9. Caso se utilizem solventes/veículos cujas propriedades não se encontrem totalmente elucidadas, devem fornecer-se dados que justifiquem a sua compatibilidade. Sempre que possível, recomenda-se a utilização de solventes/veículos aquosos. Quando forem realizados ensaios de substâncias instáveis na presença de água, os solventes orgânicos utilizados devem ser anidros.

▼B

1.5.2. **Condições do ensaio**

1.5.2.1. *Estirpes (ver 1.5.1.1)*

1.5.2.2. *Concentração de exposição*

A citotoxidade e a solubilidade na mistura final constituem alguns dos critérios a ter em conta na determinação da maior quantidade da substância em estudo a utilizar.

Poderá ser útil determinar a toxicidade e insolubilidade através de uma experiência preliminar. A citotoxicidade pode ser detectada pela redução do número de colónias com mutação reversa, pela presença de colónias mais claras ou de menores dimensões ou pelo grau de sobrevivência das culturas expostas. A citotoxidade de uma substância pode variar na presença de sistemas de activação metabólicos. A insolubilidade deve ser avaliada em função da precipitação verificável a olho nu na mistura final nas condições reais do ensaio.

A concentração máxima de ensaio recomendada para substâncias solúveis não citotóxicas é de 5 mg/placa ou de 5 µl/placa. Para as substâncias não citotóxicas insolúveis a 5 mg/placa ou a 5 µl/placa, uma ou mais das concentrações ensaiadas devem ser insolúveis na mistura final. As substâncias de ensaio citotóxicas abaixo dos 5 mg/placa ou 5 µl/placa devem ser ensaiadas até uma concentração citotóxica. O precipitado não deve interferir com a contagem.

Numa experiência inicial devem ser utilizadas pelo menos cinco concentrações analisáveis diferentes da substância em estudo, com intervalos aproximadamente semilogarítmicos (ou seja, $\sqrt{10}$) entre as concentrações. Para a investigação da relação concentração-resposta poderão ser indicados intervalos menores. Poderá ser contemplada a possibilidade de ensaiar concentrações superiores a 5 mg/placa ou 5 µl/placa quando se pretender avaliar substâncias que contenham quantidades substanciais de impurezas potencialmente mutagénicas.

1.5.2.3. *Controlos negativos e positivos*

Cada experiência deve incluir em paralelo controlos positivos e negativos (solvente ou veículo) específicos para cada estirpe, devendo, para os controlos positivos, ser escolhidas concentrações que demonstrem o desempenho eficaz de cada ensaio.

Para os ensaios com utilização de um sistema de activação metabólica, a substância de referência para os controlos positivos deve ser seleccionada com base no tipo de estirpe de bactéria utilizada.

As seguintes substâncias são exemplos de controlos positivos apropriados para os ensaios com activação metabólica:

Substância	Número CAS	Número EINECS
9,10-dimetilantraceno	781-43-1	212-308-4
7,12-dimetilbenzo[a]antraceno	57-97-6	200-359-5
benzo[a]pireno	50-32-8	200-028-5
2-aminoantraceno	613-13-8	210-330-9

▼B

Substância	Número CAS	Número EINECS
ciclofosfamida	50-18-0	200-015-4
ciclofosfamida monohidrato	6055-19-2	

A seguinte substância é um controlo positivo apropriado para o método de activação metabólico redutor:

Substância	Número CAS	Número EINECS
vermelho do Congo	573-58-0	209-358-4

O 2-aminoantraceno não deve ser utilizado como único indicador da eficácia da mistura S9. Se essa substância for utilizada, cada lote S9 deve ser igualmente caracterizado com um agente mutagénico que exija activação metabólica por enzimas microssómicos, como por exemplo o benzo[a]pireno ou o dimetilbenzo[a]an-traceno.

As seguintes substâncias são exemplos de controlos positivos específicos apropriados para cada estirpe, adequados para os ensaios sem utilização de um sistema exógeno de activação metabólica:

Substância	Número CAS	Número EINECS	Estirpe
nitrito de sódio	26628-22-8	247-852-1	TA 1535 e TA 100
2-nitrofluoreno	607-57-8	210-138-5	TA 98
9-aminoacridina	90-45-9	201-995-6	TA 1537, TA 97 e TA 97A
ICR 191	17070-45-0	241-129-4	TA 1537, TA 97 e TA 97A
hidroperóxido de isopropilben-zeno	80-15-9	201-254-7	TA 102
mitomicina C	50-07-7	200-008-6	WP2 uvrA e TA 102
N-etil-N-nitro-N-nitrosoguani-dina	70-25-7	200-730-1	WP2, WP2 uvrA e WP2 uvrA (pKM101)
4-nitroquinolina-l-óxido	56-57-5	200-281-1	WP2, WP2 uvrA e WP2 uvrA (pKM101)
furilfuramida (AF2)	3688-53-7		estirpes com plasmídeos

Podem utilizar-se no controlo positivo outras substâncias adequadas. A possibilidade de utilização de produtos químicos de uma classe afim para o controlo positivo deve ser considerada, quando existam.

Devem também realizar-se controlos negativos, consistindo apenas em solvente ou veículo e sem a substância em estudo, que serão sujeitos exactamente ao mesmo procedimento que os grupos expostos. Além disso, devem igualmente ser utilizados controlos não expostos à substância em estudo, a menos que existam dados históricos de controlo que demonstrem que o solvente escolhido não induz qualquer efeito deletério ou mutagénico.

▼B

1.5.3. **Procedimento**

Para o método de incorporação em placas (1) (2) (3) (4) sem activação metabólica, utilizam-se geralmente 0,05 ml ou 0,1 ml da solução de ensaio, 0,1 ml de cultura bacteriana fresca (aproximadamente 10^8 células viáveis) e 0,5 ml de tampão estéril, que são misturados com 2,0 ml de gelose de cobertura. Para o ensaio com activação metabólica, utilizam-se geralmente 0,5 ml de mistura de activação metabólica, que contém uma quantidade adequada de fracção pós-mitocondrial (entre 5 % a 30 % v/v na mistura de activação metabólica), misturada com a gelose de cobertura (2,0 ml), as bactérias e a substância em estudo/solução de ensaio. O conteúdo de cada tubo é misturado e deitado sobre uma placa de meio mínimo de gelose. A gelose de cobertura deve solidificar antes da incubação.

No método com incubação prévia (2) (3) (5) (6), a substância em estudo/solução de ensaio é previamente incubada com a estirpe de ensaio (aproximadamente 10^8 células viáveis) e o tampão estéril ou o sistema de activação metabólica (0,5 ml), geralmente durante 20 minutos ou mais a 30-37 °C, antes de ser misturada com a gelose de cobertura e deitada sobre uma placa com meio mínimo de gelose. Normalmente, são utilizados 0,05 ou 0,1 ml da substância em estudo/solução de ensaio, 0,1 ml de cultura bacteriana e 0,5 ml da mistura S9 ou de tampão estéril, misturados com 2,0 ml de gelose de cobertura. Os tubos devem ser arejados durante a pré-incubação, utilizando o agitador.

Para uma avaliação adequada da variação, devem ser utilizadas placas em triplicado para cada dose. A utilização de placas em duplicado é aceitável, desde que seja justificada cientificamente. A perda ocasional de uma placa não invalida necessariamente o ensaio.

As substâncias gasosas ou voláteis devem ser ensaiadas por métodos apropriados, por exemplo em recipientes selados (12) (14) (15) (16).

1.5.4. **Incubação**

Todas as placas de cada ensaio devem ser incubadas a 37°C durante 48-72 horas. Após a incubação, contam-se as colónias com mutação reversa em cada placa.

2. **DADOS**

2.1. TRATAMENTO DOS RESULTADOS

Os dados devem ser apresentados sob a forma do número de colónias com mutação reversa por placa. O número de colónias com mutação reversa nas placas de controlo negativas (controlo do solvente e, se tiver sido utilizado, controlo não exposto) e positivas deve também ser apresentado. As contagens individuais das placas, o número médio de colónias com mutação reversa por placa e o respectivo desvio-padrão devem ser apresentados para a substância em estudo e para os controlos positivos e negativos (não expostos à substância em estudo e/ou solvente).

Não há nenhuma exigência concreta para a verificação de uma resposta positiva clara. Os resultados ambíguos devem ser melhor esclarecidos, de preferência com modificação das condições experimentais. Os resultados negativos têm de ser confirmados caso a caso. Nos casos em que a confirmação dos resultados negativos não seja considerada necessária, deve ser apresentada uma justificação. Para a realização de experiências adicionais, deve ser analisada a possibilidade de modificação dos parâmetros do estudo, por forma a aumentar a gama de condições avaliadas. Os parâmetros que podem eventualmente ser alterados incluem a gama de concentrações, o método de tratamento (incorporação em placas ou pré-incubação em meio líquido) e as condições de activação metabólica.

▼B

2.2. AVALIAÇÃO E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Há diversos critérios para determinar um resultado positivo, tais como um aumento do número de colónias por placa com mutação reversa em pelo menos uma estirpe, com ou sem sistema de activação metabólico, que esteja relacionado com a concentração na gama ensaiada e/ou que seja reprodutível numa ou mais das concentrações ensaiadas (23). Deve ser tomada em consideração, antes de mais, a importância biológica dos resultados. Como auxílio para a avaliação dos resultados dos ensaios, poderão ser utilizados métodos estatísticos (24). Contudo, a significância estatística não deve ser o único elemento de determinação para uma resposta positiva.

Uma substância cujos resultados não cumpram os critérios acima indicados no presente ensaio é considerada não mutagénica.

Embora a maioria de experiências tenha resultados claramente positivos ou negativos, em casos raros o conjunto dos dados não permitirá que se obtenha uma opinião inequívoca sobre a actividade da substância em estudo, podendo acontecer que os resultados continuem a ser ambíguos ou duvidosos independentemente do número de vezes que a experiência seja repetida.

Um resultado positivo no ensaio de mutação reversa bacteriana indica que a substância induz mutações pontuais por substituição das bases ou por deslocação do quadro de leitura no genoma de *Salmondas typhimurium* e/ou *Escherichia coli.* Um resultado negativo indica que, nas condições do ensaio, a substância não é mutagénica para as espécies ensaiadas.

3. **APRESENTAÇÃO DE RELATÓRIOS**

RELATÓRIO DE ENSAIO

O relatório de ensaio deve incluir a seguinte informação:

Solvente/veículo:

— justificação para a escolha do solvente/veículo,

— solubilidade e estabilidade da substância em estudo no solvente/ /veículo, se conhecida.

Estirpes:

— estirpes usadas,

— número de células por cultura,

— características da estirpe.

Condições de ensaio:

— quantidade da substância em estudo por placa (mg/placa ou µl/placa), com justificação da escolha da dose e do número de placas preparadas por concentração,

— meios utilizados,

— tipo e composição do sistema de activação metabólica, incluindo critérios de aceitabilidade,

— protocolo do tratamento.

Resultados:

— sinais de toxicidade,

— sinais de precipitação,

— contagens individuais das placas,

▼B

— número médio de colónias com mutação reversa por placa e respectivo desvio-padrão,

— relação dose-resposta, quando seja possível de determinar,

— análise estatística, quando tenha sido realizada,

— dados relativos aos controlos negativo (solvente/veículo) e positivo realizados em paralelo com o ensaio, com as respectivas gamas, valores médios e desvios-padrão,

— dados históricos relativos aos controlos negativo (solvente/veículo) e positivo realizados em paralelo com o ensaio, com as respectivas gamas, valores médios e desvios-padrão.

Discussão dos resultados.

Conclusões.

4. **REFERÊNCIAS**

(1) Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki E., (1975) Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/ /Mammalian-Microsome Mutagenicity Test. Mutation Res., 31, p. 347-364.

(2) Maron, D.M. and Ames, B.N., (1983) Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res., 113, p. 173-215.

(3) Gatehouse, D., Haworth, S., Cebula, T., Gocke, E., Kier, L., Matsushima, T., Melcion, C., Nohmi, T., Venitt, S. and Zeiger, E., (1994) Recommendations for the Performance of Bacterial Mutation Assays. Mutation Res., 312, p. 217-233.

(4) Kier, L.D., Brusick D.J., Auletta, A.E., Von Halle, E.S., Brown, M.M., Simmon, V.F., Dunkel, V., McCann, J., Mortelmans, K., Prival, M., Rao, T.K. and Ray V., (1986) The *Salmonella typhimurium*/Mammalian Microsomal Assay: A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. Mutation Res., 168, p. 69-240.

(5) Yahagi, T., Degawa, M., Seino, Y.Y., Matsushima, T., Nagao, M., Sugimura, T. and Hashimoto, Y., (1975) Mutagenicity of Carcinogen Azo Dyes and their Derivatives, Cancer Letters, 1, p. 91-96.

(6) Matsushima, M., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A. and Sawamura, M., (1980) Factors Modulating Mutagenicity Microbial Tests. In: Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens. Ed. Norpoth K.H. and Garner, R.C., Springer, Berlin-Heidelberg-New York. p. 273-285.

(7) Gatehouse, D.G., Rowland, I.R., Wilcox, P., Callender, R.D. and Foster, R., (1980) Bacterial Mutation Assays. In: Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Part 1 Revised. Ed. D.J. Kirkland, Cambridge University Press, p. 13-61.

(8) Aeschacher, H.U., Wolleb, U. and Porchet, L., (1987) Liquid Preincubation Mutagenicity Test for Foods. J. Food Safety, 8, p. 167-177.

(9) Green, M.H.L., Muriel, W.J. and Bridges, B.A., (1976) Use of a simplified fluctuation test to detect low levels of mutagens. Mutation Res., 38, p. 33-42.

(10) Hubbard, S.A., Green, M.H.L., Gatehouse, D. and J.W. Bridges (1984) The Fluctuation Test in Bacteria. In: Handbook of Mutagenicity Test Procedures. 2nd Edition. Ed. Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C., Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, p. 141-161.

▼B

(11) Thompson, E.D. and Melampy, P.J., (1981) An Examination of the Quantitative Suspension Assay for Mutagenesis with Strains of *Salmonella typhimurium*. Environmental Mutagenesis, 3, p. 453-465.

(12) Araki, A., Noguchi, T., Kato, F. and T. Matsushima (1994) Improved Method for Mutagenicity Testing of Gaseous Compounds by Using a Gas Sampling Bag. Mutation Res., 307, p. 335-344.

(13) Prival, M.J., Bell, S.J., Mitchell, V.D., Reipert, M.D. and Vaughn, V.L., (1984) Mutagenicity of Benzidine and Benzidine-Congener Dyes and Selected Monoazo Dyes in a Modified Salmonella Assay. Mutation Res., 136, p. 33-47.

(14) Zeiger, E., Anderson, B.E., Haworth, S., Lawlor, T. and Mortelmans, K., (1992) Salmonella Mutagenicity Tests. V. Results from the Testing of 311 Chemicals. Environ. Mol. Mutagen., 19, p. 2-141.

(15) Simmon, V., Kauhanen, K. and Tardiff, R.G., (1977) Mutagenic Activity of Chemicals Identified in Drinking Water. In Progress in Genetic Toxicology, D. Scott, B. Bridges and F. Sobels (Eds.) Elsevier, Amsterdam, p. 249-258.

(16) Hughes, T.J., Simmons, D.M., Monteith, I.G. and Claxton, L.D., (1987) Vaporisation Technique to Measure Mutagenic Activity of Volatile Organic Chemicals in the Ames/Salmonella Assay. Environmental Mutagenesis, 9, p. 421-441.

(17) Matsushima, T., Matsumoto, A., Shirai, M., Sawamura, M., and Sugimura, T., (1979) Mutagenicity of the Naturally Occurring Carcinogen Cycasin and Synthetic Methylazoxy Methane Conjugates in *Salmonella typhimurium*. Cancer Res., 39, p. 3780-3782.

(18) Tamura, G., Gold, C., Ferro-Luzzi, A. and Ames, B.N., (1980) Fecalase: A Model for Activation of Dietary Glycosides to Mutagens by Intestinal Flora. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, p. 4961-4965.

(19) Wilcox, P., Naidoo, A., Wedd, D.J. and Gatehouse, D.G., (1990) Comparison of *Salmonella typhimurium* TA 102 with *Escherichia coli* WP2 Tester strains. Mutagenesis, 5, p. 285--291.

(20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T., (1976) A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer or Metabolic Activation Systems. In: «*In vitro* metabolic Activation in Mutagenesis Testing» Eds. F.J. de Serres et al. Elsevier, North Holland, p. 85-88.

(21) Elliot, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C., (1992) Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in vitro* Genotoxicity Assays. Mutagenesis, 7, p. 175-177.

(22) Maron, D., Katzenellenbogen, J. and Ames, B.N., (1981) Compatibility of Organic Solvents with the Salmonella/Microsome Test. Mutation Res., 88, p. 343-350.

(23) Claxton, L.D., Allen, J., Auletta, A., Mortelmans, K., Nestmann, E. and Zeiger, E., (1987) Guide for the *Salmonella typhimurium*/Mammalian Microsome Tests for Bacterial Mutagenicity. Mutation Res. 189, p. 83-91.

▼B

(24) Mahon, G.A.T., Green, M.H.L., Middleton, B., Mitchell, I., Robinson, W.D. and Tweats, D.J., (1989) Analysis of Data from Microbial Colony Assays. In: UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Part II. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. Ed. Kirkland, D.J., Cambridge University Press, p. 28-65.

▼M7

_____

_____

▼**M8**

B.17. ENSAIO *IN VITRO* DE MUTAÇÃO GÉNICA EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS UTILIZANDO OS GENES HPRT E XPRT

INTRODUÇÃO

1. O presente método de ensaio é equivalente à *Test Guideline* 476 (2016) da OCDE. Os métodos de ensaio são revistos periodicamente à luz do progresso científico, das necessidades normativas em evolução e de considerações de bem-estar animal. A presente versão revista do método de ensaio B.17 reflete quase trinta anos de experiência com este ensaio e resulta também do desenvolvimento de um novo método distinto consagrado a ensaios de mutação génica em células de mamíferos *in vitro* utilizando o gene da timidina-cinase. O método B.17 faz parte de uma série de métodos de ensaio no domínio da toxicologia genética. Está disponível um documento da OCDE que fornece informações sucintas sobre ensaios de toxicologia genética e resume as alterações recentemente introduzidas nas orientações da OCDE neste domínio (1).

2. O objetivo do ensaio de mutação génica em células de mamíferos *in vitro* consiste em detetar mutações génicas induzidas por produtos químicos. As linhas celulares utilizadas nestes ensaios apresentam mutações em genes repórteres, nomeadamente o gene endógeno da hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferase (*Hprt* em células de roedores, *HPRT* em células humanas; coletivamente designados como «gene *Hprt*» e «ensaio HPRT» no presente método de ensaio) e o transgene da xantina-guanina-fosforribosil-transferase (*xprt* ou *gpt*) (referido como «ensaio de XPRT»). Os ensaios de mutação HPRT e XPRT detetam diferentes gamas de ocorrências genéticas. Além dos eventos de mutação detetados pelo ensaio HPRT (por exemplo, substituição de um par de bases, deslocação do quadro de leitura, pequenas supressões e inserções), a localização autossómica do transgene *gpt* pode permitir a deteção de mutações decorrentes de grandes supressões e possivelmente a recombinação mitótica não detetada pelo ensaio HPRT porque o gene *Hprt* está localizado no cromossoma X (2) (3) (4) (5) (6) (7). Atualmente, o ensaio XPRT é menos utilizado do que o ensaio HPRT para fins normativos.

3. As definições utilizadas constam do apêndice 1.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES

4. Os ensaios realizados *in vitro* exigem geralmente a utilização de uma fonte exógena de ativação metabólica. O sistema exógeno de ativação metabólica não reproduz inteiramente as condições *in vivo*.

5. Deve ter-se o cuidado de evitar condições que conduzam a resultados falsos positivos (ou seja, a possível interação com o sistema de ensaio) não causados pela interação direta entre o produto químico em estudo e o material genético da célula; tais condições incluem variações do pH ou da pressão osmótica (8) (9) (10), interação com os componentes médios (11) (12) ou níveis excessivos de citotoxicidade (13). No ensaio HPRT, é considerada excessiva a citotoxicidade que exceda os níveis de citotoxicidade máxima recomendados, estabelecidos no ponto 19.

▼M8

6. Antes da aplicação do método de ensaio a uma mistura para obter dados com fins normativos, importa ponderar se – e, em caso afirmativo, por que motivo – o método pode proporcionar resultados adequados para o efeito. Tais considerações não são necessárias se houver um requisito normativo para o ensaio da mistura.

PRINCÍPIO DO ENSAIO

7. As células mutantes com deficiências na atividade enzimática de Hprt no ensaio HPRT ou na atividade enzimática *xprt* no ensaio XPRT são resistentes aos efeitos citostáticos da 6-tioguanina (TG), análoga da purina. As células que dispõem de Hprt (no ensaio HPRT) ou de Gpt (no ensaio VPRT) são sensíveis à TG, que causa inibição do metabolismo celular e impede a divisão da célula. Logo, as células mutantes podem proliferar na presença de TG, o que não acontece com as células normais, que contêm a enzima Hprt (no ensaio HPRT) ou Gpt (no ensaio XPRT).

8. As células em suspensão ou em cultura em monocamada são expostas ao produto químico em estudo, tanto na presença como na ausência de uma fonte exógena de ativação metabólica, (ver ponto 14) por um período apropriado (3-6 horas), sendo depois cultivadas para determinar a citotoxidade e para permitir a expressão fenotípica antes da seleção do mutante (14) (15) (16) (17). A citotoxicidade é determinada pela sobrevivência relativa (SR), ou seja, a eficiência de clonagem medida imediatamente após o tratamento e ajustada por qualquer perda de células durante o tratamento, em comparação com o controlo negativo (ponto 18 e apêndice 2). As culturas tratadas são mantidas no meio de cultura durante um período suficiente, que varia em função do tipo de célula, a fim de permitir a expressão fenotípica tão boa quanto possível das mutações induzidas (normalmente um mínimo de 7-9 dias). Após a expressão fenotípica, a frequência de mutação é determinada mediante a inoculação de um número conhecido de células num meio que contenha o agente seletivo, para a deteção de colónias mutantes, e num meio sem agente seletivo, para determinar as respetivas eficiências de clonagem (viabilidade). Após um período de incubação apropriado, as colónias são contadas. A frequência de mutação é calculada com base no número de colónias mutantes corrigido pela eficiência de clonagem no momento da seleção de mutantes.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Preparações

Células

9. Os tipos de células utilizados nos ensaios HPRT e XPRT devem ter uma sensibilidade demonstrada aos mutagéneos químicos, uma elevada eficiência de clonagem, um cariótipo estável e uma frequência de mutação espontânea estável. As células mais frequentemente utilizadas para o ensaio HPRT incluem as linhas CHO, CHL e V79 de células de hámsteres chineses, as células L5178Y do linfoma do rato e as células linfoblastóides humanas TK6 (18) (19). As células AS52 derivadas de CHO contendo o transgene *gpt* (e com o gene *Hprt* suprimido) são utilizadas para o ensaio XPRT (20) (21); o ensaio HPRT não pode ser realizado em células AS52 porque o gene *Hprt* foi suprimido. A utilização de outras linhas celulares deve ser justificada e validada.

10. As linhas celulares devem ser periodicamente verificadas quanto à estabilidade do número modal de cromossomas e à ausência de contaminação por micoplasmas (22) (23), não devendo ser utilizadas se se verificar que foram contaminadas ou que o número modal de cromossomas se alterou. A duração normal do ciclo celular das células utilizadas no laboratório de ensaio deve ser conhecida e compatível com as características celulares publicadas. Deve

▼M8

também ser verificada a frequência de mutação espontânea no banco de células principal, que não deve ser utilizado se a frequência de mutação não for aceitável.

11. Antes da realização no presente ensaio, as culturas poderão ter de ser limpas de células mutantes eventualmente presentes, por exemplo, através de culturas em meio HAT, para o ensaio HPRT, e MPA, para o ensaio de XPRT (5) (24) (ver apêndice 1). As células limpas podem ser criopreservadas e descongeladas para utilização em trabalhos ulteriores. O material recém-descongelado pode ser utilizado para o ensaio, após o tempo de duplicação normal. Ao realizar o ensaio XPRT, a cultura de rotina de células AS52 deve ser feita em condições que garantam a manutenção do transgene *gpt* (20).

Meios e condições de cultura

12. Devem manter-se as culturas em meios de cultura e condições de incubação adequados (tipo de recipiente, atmosfera humidificada com uma concentração de CO_2 de 5 % e temperatura de incubação de 37 °C). As culturas de células devem ser sempre mantidas em condições que assegurem o seu crescimento exponencial. É particularmente importante que sejam escolhidos meios e condições de cultura que garantam um crescimento ótimo das células durante o período de expressão e uma elevada eficiência de clonagem tanto para células mutantes como não mutantes.

Preparação das culturas

13. As linhas celulares são propagadas a partir de culturas de arranque, inoculadas no meio de cultura a uma densidade tal que as células em suspensão ou em monocamadas continuem a crescer exponencialmente durante o período de tratamento e de expressão (deve evitar-se, p. ex., a confluência no caso do crescimento de células em monocamadas).

Ativação metabólica

14. Se forem utilizadas células com capacidade metabólica endógena inadequada, será necessário utilizar sistemas metabolizantes exógenos. O sistema mais geralmente utilizado e que se recomenda por defeito, salvo motivo em contrário, é uma fração pós-mitocondrial reforçada com co-fator (S9) preparada a partir de fígados de roedores (em geral, ratazanas) tratados com agentes de indução enzimática, como, por exemplo, Aroclor 1254 (25) (26) (27) (28) ou uma mistura de fenobarbital e β-naftoflavona (29) (30) (31) (32). Esta última combinação não é contrária à Convenção de Estocolmo sobre Poluentes Orgânicos Persistentes (33) e relevou-se tão eficaz na indução de oxidases de função mista como o Aroclor 1254 (29) (31). A fração S9 é habitualmente utilizada em concentrações na gama de 1 % a 2 % (v/v), mas pode ser aumentada para 10 % (v/v) no meio de ensaio final. A classe de substâncias em estudo pode influenciar a escolha do tipo e da concentração do sistema de ativação metabólica exógeno ou do indutor metabólico utilizado (34)(35)(36).

Preparação do produto químico em estudo

15. Os produtos químicos sólidos em estudo devem ser adicionados a solventes adequados e, se necessário, ser diluídos antes do tratamento das células (ver ponto 16). Os produtos químicos líquidos em estudo podem ser adicionados diretamente ao sistema de ensaio e/ou ser diluídos antes de serem utilizados no tratamento do sistema de ensaio. Para o ensaio de produtos químicos gasosos ou voláteis, devem efetuar-se alterações adequadas aos protocolos normalizados, como o tratamento em recipientes de cultura fechados (37) (38). A preparação do produto químico em estudo deve ocorrer imediatamente antes do tratamento, a menos que dados de estabilidade demonstrem que o produto pode ser armazenado.

▼M8

CONDIÇÕES DE ENSAIO

Solventes

16. O solvente deve ser escolhido de modo a otimizar a solubilidade dos produtos químicos em estudo sem afetar negativamente a realização do ensaio, por exemplo, alterando o crescimento celular, afetando a integridade do produto químico em estudo, reagindo com os recipientes de cultura ou alterando o sistema de ativação metabólica. Sempre que possível, recomenda-se a utilização de um solvente (ou meio de cultura) aquoso. A água e o dimetilsulfóxido, por exemplo, são solventes cujo desempenho é bem conhecido. Em geral, os solventes orgânicos não devem exceder 1 % (v/v) e os solventes aquosos (soluções salinas ou água) não devem exceder 10 % (v/v) no meio de tratamento final. Se forem utilizados solventes cujo desempenho não é bem conhecido (p. ex., etanol ou acetona), devem fornecer-se dados que comprovem a respetiva compatibilidade com os produtos químicos em estudo e com o sistema de ensaio e a inexistência de genotoxicidade à concentração utilizada. Na ausência de dados comprovativos, é importante incluir amostras de controlo não tratadas (ver apêndice 1) para demonstrar que o solvente escolhido não tem efeitos deletérios ou clastogénicos.

Medição da citotoxicidade e escolha das concentrações de tratamento

17. Ao determinar a concentração máxima a ensaiar do produto químico em estudo, devem evitar-se concentrações capazes de gerar respostas positivas falsas, como as que produzam citotoxicidade excessiva (ver ponto 20), precipitações no meio de cultura (ver ponto 21) ou alterações pronunciadas do pH ou da pressão osmótica (ver ponto 5). Se, ao ser adicionado, o produto químico em estudo causar uma alteração pronunciada do pH do meio, o pH pode ser ajustado por tamponamento do meio de tratamento final, de modo a evitar falsos resultados positivos e manter condições de cultura adequadas.

18. A seleção da concentração baseia-se na citotoxicidade e noutras considerações (ver pontos 20-22). Embora a avaliação da citotoxicidade num ensaio inicial possa ser útil para definir melhor as concentrações a utilizar no ensaio principal, não é necessária. Mesmo no caso de se realizar uma avaliação inicial da citotoxicidade, a determinação da citotoxicidade em cada cultura continua a ser necessária no ensaio principal. A citotoxidade deve ser avaliada com recurso à RS, ou seja, à eficiência de clonagem (CE) das células, imediatamente após o tratamento, ajustada por qualquer perda de células durante o tratamento, com base na contagem celular, em comparação com a eficiência ajustada de clonagem em controlos negativos (taxa de sobrevivência de 100 %) (ver a fórmula no apêndice 2).

19. Devem ser avaliadas, pelo menos, quatro concentrações de ensaio (não incluindo as amostras de controlo positivo nem as amostras de controlo do solvente) que cumpram os critérios de aceitabilidade (citotoxicidade adequada, número de células, etc.). Embora seja aconselhável a utilização de culturas replicadas, as culturas únicas são igualmente aceitáveis em todas as concentrações a ensaiar. Os resultados obtidos com as culturas replicadas independentes, a uma dada concentração, devem ser registados separadamente, mas podem ser agrupados para fins de análise de dados (17). No caso dos produtos químicos que demonstrem pouca ou nenhuma citotoxicidade, são normalmente adequadas concentrações espaçadas por um fator de 2 a 3. Quando se observa citotoxicidade, as concentrações escolhidas devem abranger uma gama com início na concentração que produz citotoxicidade e inclua as concentrações às quais se observa pouca ou nenhuma citotoxicidade. Muitos produtos químicos em estudo apresentam curvas concentração-resposta com declive acentuado, pelo que, para obter dados sobre toda a gama de citotoxicidade ou para analisar em pormenor a relação concentração-resposta, pode ser necessário recorrer a concentrações menos espaçadas e a

▼M8

mais de quatro concentrações, em especial nas situações em que for necessário repetir o ensaio (ver ponto 43). A utilização de mais de quatro concentrações pode ser particularmente importante quando se utilizam culturas únicas.

20. Se a concentração máxima se basear na citotoxicidade, a concentração mais elevada deverá atingir um valor entre 20 % e 10 % RS. Deve ser-se cauteloso na interpretação de resultados positivos que se obtêm apenas a 10 % ou menos (ver ponto 43).

21. No caso de produtos químicos pouco solúveis não-citotóxicos a concentrações inferiores à concentração insolúvel mínima, a maior concentração analisada deve gerar, no final do tratamento com o produto químico em estudo, turbidez ou um precipitado visível a olho nu ou com auxílio de um microscópio invertido. Mesmo no caso de se observar citotoxicidade acima da menor concentração insolúvel, é conveniente ensaiar uma única concentração que produza turbidez ou um precipitado visível, devido aos efeitos falsos que possam ser induzidos pelo precipitado. À concentração que produz um precipitado, deve assegurar-se que este não interfere com a realização do ensaio. Neste contexto, pode ser útil determinar a solubilidade no meio de cultura antes do ensaio.

22. Se não se observar precipitação nem citotoxicidade condicionante, a maior concentração ensaiada deve corresponder à menor das seguintes concentrações: 10 mM, 2 mg/ml ou 2 µl/ml (39) (40). Se o produto químico em estudo não for de composição definida – caso, p. ex., de uma substância de composição desconhecida ou variável, de produtos de reação complexos ou de materiais biológicos (UVCB) (41), de extratos ambientais, etc. –, a concentração de topo poderá ter de ser mais elevada (p. ex., 5 mg/ml) na ausência de citotoxicidade suficiente, para aumentar a concentração de cada um dos componentes. Importa, contudo, notar que estes requisitos podem diferir no caso de medicamentos para uso humano (42).

Controlos

23. Para cada uma das condições experimentais, devem também realizar-se controlos negativos paralelos (ver ponto 16), em que as células são expostas apenas ao solvente e ao meio de tratamento, procedendo-se do mesmo modo que num ensaio normal.

24. São necessários controlos positivos para demonstrar a capacidade do laboratório para identificar mutagénios nas condições do protocolo de ensaio, bem como a eficácia do sistema exógeno de ativação metabólica, se pertinente. O quadro 1 apresenta exemplos de produtos químicos de controlo positivo. Se tal se justificar, podem utilizar-se outras substâncias de controlo positivo. Dado que os ensaios de toxicidade genética *in vitro* em células de mamíferos estão suficientemente normalizados, podem realizar-se ensaios que utilizem tratamentos com ou sem ativação metabólica exógena utilizando apenas um controlo positivo que necessite de ativação metabólica. Neste caso, a resposta de controlo positivo única demonstrará a atividade do sistema de ativação metabólica e a capacidade de resposta do sistema de ensaio. Cada controlo positivo deve ser utilizado numa ou mais das concentrações a que se prevê um aumento detetável e reprodutível relativamente à base, a fim de demonstrar a sensibilidade do sistema de ensaio e a resposta não deve ser comprometida por uma concentração de citotoxicidade superior aos limites especificados no presente método de ensaio (ver ponto 20).

▼M8

Quadro 1

Substâncias de referência recomendadas para a avaliação da competência do laboratório e para a seleção dos controlos positivos

Condição de ativação metabólica	Locus	Substância e n.º CAS
Ausência de ativação metabólica exógena	*Hprt*	Metanossulfonato de etilo [n.º CAS 62-50-0] Etilnitrosureia [n.º CAS 759-73-9] 1-Óxido de 4-nitroquinolina [número CAS 56-57-5]
	xprt	Estreptonigrina (n.º CAS 3930-19-6) Mitomicina C [n.º CAS 50-07-7]
Presença de ativação metabólica exógena	*Hprt*	3-Metilcolantreno [n.º CAS 56-49-5] 7,12-Dimetilbenzantraceno [n.ºCAS 57-97-6] Benzo[a]pireno [n.º CAS 50-32-8]
	xprt	Benzo[a]pireno [n.º CAS 50-32-8]

PROCEDIMENTO

Tratamento com o produto químico em estudo

25. As células em proliferação são expostas ao produto químico em estudo na presença e na ausência de um sistema de ativação metabólica. A exposição deve ter uma duração adequada (normalmente, é adequada uma duração de 3 a 6 horas).

26. O número mínimo de células utilizado para cada cultura de ensaio (controlada e tratada), em cada fase do ensaio, deve basear-se na frequência de mutação espontânea. Uma orientação geral consiste em tratar e transferir células suficientes para manter 10 mutantes espontâneas em todas as culturas em todas as fases do ensaio (17). A frequência de mutação espontânea é, em geral, entre 5 e 20 × 10^{-6}. Para uma frequência de mutação espontânea de 5 × 10^{-6} e para manter um número suficiente de mutantes espontâneos (10 ou mais), mesmo para culturas expostas a concentrações que provoquem 90 % de citotoxicidade durante o tratamento (10 % RS), será necessário tratar, pelo menos, 20 × 10^{6} células. Além disso, deve ser cultivado um número suficiente de células (nunca inferior a 2 milhões) durante o período de expressão e incubadas em placas para seleção de mutantes (17).

Período de expressão fenotípica e medição da frequência de mutação

27. Após o período de exposição, as células são cultivadas para permitir a expressão fenotípica das mutações. Regra geral, um mínimo de 7 a 9 dias é suficiente para permitir a expressão fenotípica quase ótima dos mutantes Hprt e xprt recentemente induzidos (43) (44). Durante este período, as células são regularmente subcultivadas, a fim de serem mantidas em crescimento exponencial. Após a expressão fenotípica, as células são incubadas em placas em meio com e sem agente seletivo (6-tioguanina) para determinação do número de mutações e da eficiência de clonagem no momento da seleção, respetivamente. Esta incubação em placas pode ser realizada usando pratos para monocamada ou placas de microcamada para células em suspensão. Para a seleção de mutantes, as células devem ser incubadas em placas a uma densidade que garanta uma taxa de mutação ótima (ou seja, que evite a cooperação metabólica) (17). As placas são incubadas durante um período adequado para potenciar o crescimento das colónias (por exemplo, 7-12 dias) e são contadas. A frequência de mutação é calculada com base no número de colónias mutantes corrigido pela eficiência de clonagem no momento da seleção de mutantes (ver fórmulas no apêndice 2).

▼M8

Competência técnica do laboratório

28. A fim de comprovar que possui experiência suficiente na realização do ensaio antes de passar a utilizar este método em ensaios de rotina, o laboratório deve ter efetuado uma série de experiências com substâncias de referência positivas que ajam por diferentes mecanismos (pelo menos uma ativa com e outra ativa sem ativação metabólica, sendo as substâncias correspondentes selecionadas da lista constante do quadro 1), bem como várias amostras de controlo negativas (utilizando vários solventes/excipientes). As respostas observadas às amostras de controlo positivas e negativas devem ser corroboradas por referências bibliográficas. Este requisito não é aplicável a laboratórios com experiência, isto é, que disponham de uma base de dados históricos como se refere nos pontos 30 a 33.

29. Deve ser investigada uma seleção de substâncias de controlo positivo (ver quadro 1 do ponto 25), com e sem ativação metabólica, a fim de demonstrar a sua competência na deteção de produtos químicos mutagénicos, para determinar a eficácia do sistema de ativação metabólica e demonstrar a adequação das condições de crescimento das células durante o tratamento, da expressão fenotípica, da seleção de mutantes e dos métodos de contagem. A gama de concentrações das substâncias selecionadas deve ser escolhida de forma a proporcionar aumentos reprodutíveis e dependentes da concentração, relativamente ao nível de fundo, que permitam demonstrar a sensibilidade e a gama dinâmica do sistema de ensaio.

Dados históricos de controlo

30. O laboratório deve elaborar:

— um historial da gama e da distribuição dos controlos positivos;

— um historial da gama e da distribuição dos controlos negativos (amostras não tratadas, solvente).

31. Ao obter os primeiros dados para um historial de distribuição dos controlos negativos, os controlos negativos em paralelo devem ser coerentes com os dados de controlo publicados, caso existam (22). À medida que forem sendo adicionados mais dados experimentais à distribuição dos controlos, os controlos negativos em paralelo devem, de preferência, situar-se dentro dos limites de controlo de 95 % daquela distribuição (17) (45) (46).

32. A base de dados históricos de controlo negativo deve ser inicialmente constituída por um mínimo de 10 experiências, embora de preferência, seja constituída por, pelo menos, 20 experiências efetuadas em condições experimentais comparáveis. Os laboratórios devem utilizar métodos de controlo de qualidade, como gráficos de controlo – por exemplo, gráficos C ou gráficos de barras (47) –, para identificar a variabilidade dos seus dados de controlo positivo e de controlo negativo e demonstrar que o laboratório domina a metodologia (46). Encontram-se na bibliografia (45) outras recomendações sobre a forma de obter e utilizar os dados históricos (critérios de inclusão e exclusão de dados em séries históricas e critérios de aceitação para um determinado ensaio).

33. Os dados de controlo negativo devem consistir em frequências mutantes em culturas únicas ou, de preferência, replicadas, conforme descrito no ponto 23. Os controlos negativos realizados em paralelo devem, idealmente, situar-se dentro dos limites de 95 % dos controlos da distribuição da base de dados históricos de controlo negativo do laboratório (17) (45) (46). Os dados do controlo negativo realizado em paralelo que se situem fora dos limites de controlo de 95 % são aceitáveis para inclusão no historial de distribuição de controlo se não forem valores extremos e ainda se houver indícios de que o sistema de ensaio está «sob controlo» (ver *supra*) e não houver indícios da existência de erros humanos ou técnicos.

▼M8

34. Quaisquer alterações do protocolo experimental devem ser ponderadas em função da sua coerência com as bases de dados históricos de controlo do laboratório. As incoerências de monta devem conduzir à constituição de uma nova base de dados históricos de controlo.

DADOS E RELATÓRIOS

Apresentação dos resultados

35. A apresentação dos resultados deve incluir todos os dados necessários para calcular a citotoxicidade (expressa em RS). Os dados, tanto para as culturas tratadas como para as de controlo, devem incluir o número de células no final da exposição, o número de células incubadas em placas imediatamente após o tratamento e o número de contagens de colónias (ou número de poços sem colónias, para o método micropoços). A RS para cada cultura deve ser expressa em percentagem em relação à amostra de controlo do solvente ensaiada em paralelo (ver definições no apêndice 1).

36. A apresentação dos resultados deve incluir também todos os dados necessários para calcular a frequência de mutação. Os dados das culturas tratadas e das culturas de controlo devem incluir: (1) o número de células incubadas em placas com e sem agente seletivo (no momento em que as células são colocadas em placas para seleção mutante) e (2) o número de colónias contadas (ou o número de poços sem colónias sem colónias no método de micropoços) nas placas, com e sem agente seletivo. A frequência de mutação é calculada com base no número de colónias mutantes (em placas com agente seletivo) corrigido pela eficiência de clonagem (a partir das placas sem agente seletivo). A frequência de mutação deve ser expressa em número de células mutantes por milhão de células viáveis (ver definições no apêndice 1).

37. Devem ser fornecidos dados individuais das culturas. Os dados devem ser fornecidos por cultura e resumidos em quadros.

Critérios de aceitabilidade

38. A aceitação do ensaio baseia-se nos seguintes critérios:

— Um controlo negativo realizado em paralelo é considerado aceitável para inclusão na base de dados históricos de controlo negativo do laboratório, nos termos descritos no ponto 33.

— As amostras de controlo positivo (ver ponto 24) devem induzir respostas compatíveis com as incluídas na base de dados históricos de controlo positivo e produzir um aumento estatisticamente significativo relativamente ao controlo negativo em paralelo.

— Foram ensaiadas duas condições experimentais (com e sem ativação metabólica), a menos que tenha sido possível obter resultados positivos numa (ver ponto 25).

— É analisável um número adequado de células e concentrações (pontos 25, 26 e 19).

— Os critérios para a seleção da concentração de topo são coerentes com os descritos nos pontos 20, 21 e 22.

Avaliação e interpretação dos resultados

39. Se forem cumpridos todos os critérios de aceitabilidade, o produto químico em estudo é considerado inequivocamente positivo se, em qualquer das condições experimentais examinadas:

▼M8

— pelo menos uma das concentrações de ensaio apresentar um aumento estatisticamente significativo em relação ao controlo negativo,

— o aumento, avaliado com base numa análise de tendências adequada, for dependente da concentração,

— nenhum dos resultados estiver fora da distribuição dos dados históricos de controlo negativo (p. ex., limites de controlo de 95 % com base numa distribuição de Poisson; ver ponto 33).

Se todos estes critérios estiverem preenchidos, o produto químico em estudo é considerado passível de induzir mutações génicas em células de mamífero cultivadas no presente sistema de ensaio. As referências bibliográficas (46) (48) contêm recomendações sobre os métodos estatísticos mais adequados.

40. Se forem cumpridos todos os critérios de aceitabilidade, o produto químico em estudo é considerado inequivocamente negativo se, em todas as condições experimentais examinadas:

— nenhuma das concentrações de ensaio apresentar um aumento estatisticamente significativo em relação ao controlo negativo paralelo,

— não se observar qualquer aumento dependente da concentração, numa avaliação feita com base numa análise de tendências adequada;

— todos os resultados se situarem dentro da distribuição dos dados históricos de controlo negativo (p. ex., limites de controlo de 95 % com base numa distribuição de Poisson; ver ponto 33).

Nesse caso, o produto químico em estudo não é considerado passível de induzir mutações génicas em culturas de células de mamíferos neste sistema de ensaio.

41. Não há qualquer exigência concreta para a verificação de uma resposta inequivocamente positiva ou negativa.

42. No caso de a resposta não ser inequivocamente positiva ou negativa como atrás descrito, ou para estabelecer a importância biológica do resultado, os dados devem ser avaliados por peritos e/ou numa investigação complementar. Pode ser útil um ensaio de repetição, eventualmente com alteração das condições experimentais (intervalo diferente entre as concentrações ou outras condições de ativação metabólica — p. ex., concentração ou origem do S9).

43. Em casos raros, mesmo após estudos complementares, os dados obtidos não permitirão concluir por um resultado positivo ou negativo. Assim, deve concluir-se que a resposta do produto químico em estudo é ambígua (interpretada como igualmente suscetível de ser positiva ou negativa).

Relatório de ensaio

44. O relatório de ensaio deve conter as seguintes informações:

Produto químico em estudo

— origem, número de lote e data-limite de utilização, se conhecidos;

— estabilidade, se conhecida;

— solubilidade e estabilidade no solvente, se conhecidas;

— medição do pH, da pressão osmótica e da quantidade de precipitado no meio de cultura ao qual foi adicionado o produto químico em estudo, consoante o que for adequado.

▼**M8**

Substância monocomponente

— aspeto físico, hidrossolubilidade e outras propriedades físico-químicas pertinentes;

— dados de identificação química, como as denominações IUPAC ou CAS, número CAS, código SMILES ou InChI, fórmula estrutural, pureza, identidade química de impurezas, caso se justifique e seja exequível, etc.

Substância multicomponentes, UVCB e misturas

— caracterizada, na medida do possível, pela identidade química (ver acima), pela ocorrência quantitativa e pelas propriedades físico-químicas dos componentes.

Solvente

— justificação da escolha;

— percentagem no meio de cultura final.

Células

Para as culturas principais de laboratório:

— tipo e fonte das linhas celulares;

— número de passagens, se disponível, e histórico no laboratório;

— características do cariótipo e/ou número modal de cromossomas.

— métodos de manutenção das culturas celulares;

— ausência de micoplasma;

— tempo de duplicação celular.

Condições de realização do ensaio

— justificação para a seleção das concentrações e do número de culturas, incluindo, por exemplo, dados sobre a citotoxicidade e sobre as limitações de solubilidade;

— composição dos meios, concentração de CO_2, nível de humidade;

— concentração do produto químico em estudo, expressa em concentração final no meio de cultura (p. ex., µg ou mg/ml ou mM do meio de cultura);

— concentração (e/ou volume) de solvente e de produto químico em estudo adicionado ao meio de cultura;

— temperatura de incubação;

— tempo de incubação;

— duração do tratamento;

— densidade celular durante a exposição;

— tipo e composição do sistema de ativação metabólica (fonte de S9, método de preparação da mistura de S9, concentração ou volume da mistura de S9 e de S9 no meio de cultura final, controlos de qualidade do S9); substâncias de controlo positivo e negativo, concentrações finais para cada condição de tratamento;

— duração do período de expressão (incluindo o número de células inoculadas e os calendários de subcultura e de alimentação, quando aplicável),

▼**M8**

— identidade do agente seletivo e respetiva concentração;

— critérios de aceitabilidade dos ensaios;

— métodos utilizados para a enumeração dos números de células mutantes e viáveis,

— métodos de medição da citotoxicidade;

— outros dados pertinentes relativos à citotoxicidade e ao método utilizado;

— duração dos períodos de incubação após a colocação em placas;

— critérios definidos para que o estudo seja considerado positivo, negativo ou não conclusivo;

— métodos utilizados para determinar o pH, a pressão osmótica e a precipitação.

Resultados

— número de células expostas e número de células subcultivadas para cada cultura;

— medições de citotoxicidade e outras observações, se for caso disso;

— sinais de precipitação e instante da determinação;

— número de células colocadas em placas em meio seletivo e não seletivo;

— número de colónias em meio não seletivo, número de colónias resistentes em meio seletivo e frequências de mutação conexas;

— relação concentração-resposta, quando for possível determiná-la;

— dados (concentrações e solventes) relativos às amostras de controlo negativo (solvente) e de controlo positivo, ensaiadas em paralelo;

— dados históricos relativos aos controlos positivos e negativos (solvente), com as respetivas gamas, valor médio e desvio-padrão e intervalo de confiança (por exemplo, 95 %), bem como o número de dados;

— análises estatísticas (para culturas individuais e replicados agrupados, se for caso disso) e valores p, caso existam.

Discussão dos resultados.

Conclusão

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(1) OCDE (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No 234, OECD, Paris.

(2) Moore M.M., DeMarini D.M., DeSerres F.J. and Tindall, K.R. (Eds.) (1987). Banbury Report 28: Mammalian Cell Mutagenesis, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, New York.

▼**M8**

(3) Chu E.H.Y. and Malling H.V. (1968). Mammalian Cell Genetics. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells *In Vitro*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 61, 1306-1312.

(4) Moore M.M., Harrington-Brock K., Doerr C.L. and Dearfield K.L. (1989). Differential Mutant Quantitation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci. Mutagen. Res., 4, 394-403.

(5) Aaron C.S. and Stankowski Jr. L.F. (1989). Comparison of the AS5 2/XPRT and the CHO/HPRT Assays: Evaluation of Six Drug Candidates. Mutation Res.,223, 121-128.

(6) Aaron C.S., Bolcsfoldi G., Glatt H.R., Moore M., Nishi Y., Stankowski L., Theiss J. and Thompson E. (1994). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Working Group Report. Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Mutation Res.,312, 235-239.

(7) Li A.P., Gupta R.S., Heflich R.H. and Wasson J. S. (1988). A Review and Analysis of the Chinese Hamster Ovary/Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase System to Determine the Mutagenicity of Chemical Agents: A Report of Phase III of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-tox Program.Mutation Res., 196, 17-36.

(8) Scott D., Galloway S.M., Marshall R.R., Ishidate M., Brusick D., Ashby J. and Myhr B.C. (1991). Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A Report from ICPEMC Task Group 9. Mutation Res., 257, 147-204.

(9) Morita T., Nagaki T., Fukuda I. and Okumura K. (1992). Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells. Mutation Res., 268, 297-305.

(10) Brusick D. (1986). Genotoxic Effects in Cultured Mammalian Cells Produced by Low pH Treatment Conditions and Increased Ion concentrations, Environ. Mutagen., 8, 789-886.

(11) Nesslany F., Simar-Meintieres S., Watzinger M., Talahari I. and Marzin D. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. Environ. Mol. Mutation Res., 49, 439-452.

(12) Long L.H., Kirkland D., Whitwell J. and Halliwell B. (2007). Different Cytotoxic and Clastogenic Effects of Epigallocatechin Gallate in Various Cell-Culture Media Due to Variable Rates of its Oxidation in the Culture Medium, Mutation Res., 634, 177-183.

(13) Kirkland D., Aardema M., Henderson L., and Müller L. (2005). Evaluation of the Ability of a Battery of Three *In Vitro* Genotoxicity Tests to Discriminate Rodent Carcinogens and Non-Carcinogens. I: Sensitivity, Specificity and Relative Predictivity. Mutation Res., 5841-256.

(14) Li A.P., Carver J.H., Choy W.N., Hsie A.W., Gupta R.S., Loveday K.S., O'Neill J.P., Riddle J.C., Stankowski L.F. Jr. and Yang L.L. (1987). A Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary Cell/Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay. Mutation Res., 189, 135-141.

(15) Liber H.L., Yandell D.W. and Little J.B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HPRT Loci in Human Lymphoblastoid Cells; Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK Locus. Mutation Res., 216, 9-17.

(16) Stankowski L.F. Jr., Tindall K.R. and Hsie A.W. (1986). Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanesulfonate- and ICR 191--Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanesulfonate- and ICR 191-Induced Mutation in AS52 Cells. Mutation Res., 160, 133-147.

▼**M8**

(17) Arlett C.F., Smith D.M., Clarke G.M., Green M.H.L., Cole J., McGregor D.B. and Asquith J.C. (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J. (Eds.), CambridgeUniversity Press, pp. 66-101.

(18) Hsie A.W., Casciano D.A., Couch D.B., Krahn D.F., O'Neill J.P., and Whitfield B.L. (1981). The Use of Chinese Hamster Ovary Cells to Quantify Specific Locus Mutation and to Determine Mutagenicity of Chemicals; a Report of the Gene-Tox Program, Mutation Res., 86, 193-214.

(19) Li A.P. (1981). Simplification of the CHO/HGPRT Mutation Assay Through the Growth of Chinese Hamster Ovary Cells as Unattached Cultures, Mutation Res., 85, 165-175.

(20) Tindall K.R., Stankowski Jr., L.F., Machanoff R., and Hsie A.W. (1984). Detection of Deletion Mutations in pSV2*gpt*-Transformed Cells, Mol. Cell. Biol., 4, 1411-1415.

(21) Hsie A. W., Recio L., Katz D. S., Lee C. Q., Wagner M., and Schenley R. L. (1986). Evidence for Reactive Oxygen Species Inducing Mutations in Mammalian Cells. Proc Natl Acad Sci., 83(24): 9616–9620.

(22) Lorge E., Moore M., Clements J., Donovan M. O., Honma M., Kohara A., Van Benthem J., Galloway S., Armstrong M.J., Thybaud V., Gollapudi B., Aardema M., Kim J., Sutter A., Kirkland D.J. (2015). Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. (Manuscrito em preparação).

(23) Coecke S., Balls M., Bowe G., Davis J., Gstraunthaler G., Hartung T., Hay R., Merten O.W., Price A., Schechtman L., Stacey G. and Stokes W. (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, ATLA, 33, 261-287.

(24) Rosen M.P., San R.H.C. and Stich H.F. (1980). Mutagenic Activity of Ascorbate in Mammalian Cell Cultures, Can. Lett. 8, 299-305.

(25) Natarajan A.T., Tates A.D, Van Buul P.P.W., Meijers M. and de Vogel N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens after Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. Mutation Res., 37, 83--90.

(26) Abbondandolo A., Bonatti S., Corti G., Fiorio R., Loprieno N. and Mazzaccaro A. (1977). Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome-Activated Dimethylnitrosamine. Mutation Res., 46, 365-373.

(27) Ames B.N., McCann J. and Yamasaki E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test. Mutation Res., 31, 347-364.

(28) Maron D.M. and Ames B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res., 113, 173, 215.

(29) Elliott B.M., Combes R.D., Elcombe C.R., Gatehouse D.G., Gibson G.G., Mackay J.M. and Wolf R.C. (1992) Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. Mutagen. 7, 175--177.

(30) Matsushima T., Sawamura M., Hara K. and Sugimura T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. In: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, de Serres F.J., Fouts J.R., Bend J.R. and Philpot R.M. (Eds), Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

▼**M8**

(31) Ong T.-m., Mukhtar M., Wolf C.R. and Zeiger E. (1980). Differential Effects of Cytochrome P450-Inducers on Promutagen Activation Capabilities and Enzymatic Activities of S-9 from Rat Liver, J. Environ. Pathol. *Toxicol*., 4, 55-65.

(32) Johnson T.E., Umbenhauer D.R. and Galloway S.M. (1996). Human Liver S-9 Metabolic Activation: Proficiency in Cytogenetic Assays and Comparison with Phenobarbital/beta-Naphthoflavone or Aroclor 1254 Induced Rat S-9, Environ. Mol. Mutagen., 28, 51-59.

(33) UNEP. (2001). Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP). Disponível em: [http://www.pops.int.html].

(34) Tan E.-L. and Hsie A.W. (1981). Effect of Calcium Phosphate and Alumina Cγ Gels on the Mutagenicity and Cytotoxicity of Dimethylnitrosamine as Studied in the CHO/HGPRT System. Mutation Res., 84, 147-156.

(35) O'Neill J.P., Machanoff R., San Sebastian J.R., Hsie A.W. (1982). Cytotoxicity and Mutagenicity of Dimethylnitrosamine in Cammalian Cells (CHO/HGPRT system): Enhancement by Calcium Phosphate. Environ. Mol. Mutation., 4, 7-18.

(36) Li, A.P. (1984). Use of Aroclor 1254-Induced Rat Liver Homogenate in the Assaying of Promutagens in Chinese Hamster Ovary Cells. Environ. Mol. Mutation, 4, 7-18.

(37) Krahn D.F., Barsky F.C. and McCooey K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. In: Tice, R.R., Costa, D.L., Schaich, K.M. (eds.) Genotoxic Effects of Airborne Agents. New York, Plenum, pp. 91-103.

(38) Zamora P.O., Benson J.M., Li A.P. and Brooks A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. Environ. Mutagen.,5, 795-801.

(39) OCDE (2014). Document Supporting the WNT Decision to Implement Revised Criteria for the Selection of the Top Concentration in the *In Vitro* Mammalian Cell Assays on Genotoxicity (Test Guidelines 473, 476 and 487). Disponível a pedido da Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Económicos.

(40) Brookmire L., Chen J.J. and Levy D.D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In Vitro* Chromosome Aberrations Assay, Environ. Mol. Mutation, 54, 36-43.

(41) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention. (2011). Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances,

(42) USFDA (2012). International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use. Disponível em:[https://federalregister.gov/a/2012-13774].

(43) O'Neill J.P. and Hsie A.W. (1979). Phenotypic Expression Time of Mutagen-Induced 6-thioguranine resistance in Chinese hamster ovary cells (CHO/HGPRT system), Mutation, Res., 59, 109-118.

(44) Chiewchanwit T., Ma H., El Zein R., Hallberg L., e Au W.W. (1995). Induction of Deletion Mutations by Methoxyacetaldehyde in Chinese Hamster Ovary (CHO)-AS52 cells. Mutation, Res., 1335(2):121-8.

▼**M8**

(45) Hayashi M., Dearfield K., Kasper P., Lovell D., Martus H.J., and Thybaud V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data, Mutation, Res., 723, 87-90.

(46) OCDE (2014). Statistical Analysis Supporting the Revision of the Genotoxicity Test Guidelines. Environmental, Health and Safety, Series on testing and assessment (No 199), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(47) Richardson C., Williams D.A., Allen J.A., Amphlett G., Chanter D.O., and Phillips B. (1989). Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. Kirkland, D.J., (Ed) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.

(48) Fleiss J. L., Levin B., and Paik M. C. (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions, Third Edition, New York: John Wiley & Sons.

▼**M8**

Apêndice 1

DEFINIÇÕES

Amostra de controlo do solvente: termo geral que define as culturas de controlo tratadas apenas com o solvente utilizado para dissolver o produto químico em estudo.

Amostra de controlo não tratada: cultura não sujeita a qualquer tratamento (com o produto químico em estudo ou solvente), mas processada simultaneamente e do mesmo modo que as culturas tratadas com o produto químico em estudo.

Citotoxicidade: para efeitos dos ensaios abrangidos pelo presente método de ensaio, a citotoxicidade é definida como uma redução da sobrevivência relativa das células expostas comparativamente com o controlo negativo (ver ponto específico).

Concentrações: refere-se às concentrações finais do produto químico em estudo no meio de cultura.

Eficiência de clonagem: a percentagem de células incubadas em placas em baixa densidade que consegue originar uma colónia que pode ser contada.

Fração S9 de fígado: sobrenadante após centrifugação do homogeneizado hepático a 9 000 g (extrato hepático em bruto).

Frequência de mutação (MF): número de colónias mutantes observadas dividido pelo número de células incubadas em placas em meio seletivo, corrigido pela eficiência de clonagem (ou viabilidade) no momento da seleção.

Genotóxico: termo geral que abrange todos os tipos de danos ao ADN ou aos cromossomas, incluindo quebra do ADN, aduções, rearranjos, mutações, aberrações cromossomáticas e aneuploidia. Nem todos os tipos de efeitos genotóxicos originam mutações ou danos cromossómicos estáveis.

Meio HAT: meio que contém hipoxantina, aminopterina e timidina, utilizado para limpeza de mutantes Hprt.

Meio MPA: meio que contém xantina, adenina, timidina, aminopterina e ácido microfenólico, utilizado para limpeza de mutantes xprt.

Mistura S9: mistura de fração S9 de fígado e dos cofatores necessários à atividade enzimática metabólica.

Mutação para diante: mutação genética do tipo parental para a forma mutante que causa uma alteração ou perda de atividade enzimática da função da proteína codificada.

Mutagéneos por deslocação do quadro de leitura: produtos químicos que causam a adição ou supressão de um par de bases ou de uma sequência de pares de bases do ADN.

Mutagéneos por substituição de um par de bases: produtos químicos que causam a substituição de pares de bases do ADN.

Mutagénico: que produz uma alteração hereditária de sequências de pares de bases do ADN em genes ou da estrutura dos cromossomas (aberrações cromossómicas).

▼**M8**

Período de expressão fenotípica: o período após o tratamento durante o qual a modificação genética é fixada no genoma e os produtos dos genes inalterados se esgotam ao ponto de alterar o caráter fenotípico.

Produto químicouma substância ou mistura.Sobrevivência relativa (SR): a SR é utilizada para medir a citotoxicidade relacionada com a exposição. a SR é a eficiência de clonagem (CE) de células incubada em placas imediatamente após a exposição, ajustada por qualquer perda de células durante a exposição, em comparação com a eficiência de clonagem em controlos negativos (com uma taxa de sobrevivência de 100 %).

Produto químico em estudo: qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado o presente método de ensaio.

Recombinação mitótica: durante a mitose, a recombinação entre cromatídeos homólogos, eventualmente resultante na indução de quebras em cadeias duplas do ADN ou numa perda de heterozigotia.

UVCB: substâncias químicas de composição desconhecida ou variável, produtos de reação complexos e materiais biológicos.

▼M8

Apêndice 2

FÓRMULAS PARA A AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E DA FREQUÊNCIA DE MUTAÇÃO

A citotoxicidade é avaliada pela sobrevivência relativa, ou seja pela eficiência de clonagem (CE) de células incubada em placas imediatamente após a exposição, ajustada por qualquer perda de células durante a exposição, em comparação com a eficiência de clonagem ajustada em controlos negativos (com uma taxa de sobrevivência de 100 %) (ver fórmula RS *infra*).

A CE ajustada para uma cultura tratada pelo produto químico em estudo é calculada do seguinte modo:

$$\text{CE ajustada} = \frac{\text{Número de células no final do tratamento}}{\text{Número de células no início do tratamento}}$$

Para uma cultura tratada pelo produto químico em estudo, a RS é calculada do seguinte modo:

$$\text{RS} = \frac{\text{CE ajustada na cultura tratada}}{\text{CE ajustada na controlo com solvente}} \times 100$$

A frequência de mutação é a eficiência de clonagem de colónias mutantes num meio seletivo dividida pela eficiência de clonagem num meio não seletivo medido para a mesma cultura no momento da seleção.

$$\text{Frequência de mutação} = \frac{\text{Eficiência de clonagem de colónias mutantes num meio seletivo}}{\text{Eficiencia de clonagem num meio nao seletivo}}$$

Se forem utilizadas placas para a eficiência de clonagem:

CE = número de colónias/número de células incubadas em placas.

Quando forem utilizadas placas de micropoços para a eficiência de clonagem:

O número de colónias por poço nas placas de micropoços segue uma distribuição de Poisson.

Eficiência de clonagem = -LnP(0) / número de células incubadas por poço

Em que -LnP(0) é o número provável de poços vazios de entre os poços inoculados e é descrito pela seguinte fórmula:

LNP (0) = -Ln (número de poços vazios/número de poços inoculados).

▼M7

_____

_____

_____

▼B

B.21. **TESTES DE TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS DE MAMÍFERO *IN VITRO***

1. **MÉTODO**

1.1. INTRODUÇÃO

Ver Introdução Geral, parte B.

1.2. DEFINIÇÃO

Ver Introdução Geral, parte B.

1.3. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

Nenhuma.

1.4. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

Podem utilizar-se sistemas de cultura de células de mamífero para detectar *in vitro* alterações do fenótipo induzidas por substâncias químicas associadas com uma transformação maligna *in vivo*. Entre as culturas mais frequentemente utilizadas contam-se as C3H1OT 1/2, 3T3, SHE, rato Fischer; os testes baseiam-se nas alterações da morfologia celular, formação de ninhos celulares ou alterações ligadas à necessidade de ancoragem a um agar semi-sólido. Existem outros sistemas menos frequentemente utilizados que detectam outras alterações fisiológicas ou morfológicas nas células depois de uma exposição a carcinogénios químicos. Nenhum dos fenómenos finais destes testes *in vitro* apresenta uma relação mecanicista estabelecida com o cancro. Alguns dos sistemas de testes são capazes de detectar promotores de tumores. Pode determinar-se a citotoxicidade medindo o efeito da substância a testar sobre a capacidade para formar uma colónia (eficácia de *cloning*) ou ainda sobre as taxas de crescimento das culturas. A medição da citotoxicidade tem por fim determinar se a exposição da substância testada foi toxicologicamente significativa mas não pode servir para calcular a frequência das transformações em todas as provas uma vez que algumas destas podem implicar uma incubação prolongada e/ou uma nova passagem.

1.5. CRITÉRIOS QUALITATIVOS

Nenhum.

1.6. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

Preparativos

Células

Podem ser utilizadas várias linhas celulares ou células primárias, dependendo do teste de transformação utilizado. O investigador deve assegurar-se de que as células do teste efectuado apresentam a alteração fenotípica adequada depois da exposição a carcinogénios conhecidos e que a validade e fiabilidade do teste efectuado no seu laboratório sejam comprovadas e documentadas.

Meio

Deverão utilizar-se meios e condições de ensaio adequados ao teste de transformação utilizado.

▼B

Substância a testar

As substâncias a testar podem ser preparadas nos meios de cultura, e dissolvidas ou colocadas em suspensão em veículos apropriados antes do tratamento das células. A concentração final do veículo no sistema de cultura não deve afectar a viabilidade celular nem a taxa de crescimento, nem a incidência de transformações.

Activação metabólica

As células deverão ser expostas à substância a testar na presença e na ausência de um sistema de activação metabólica adequado. Alternativamente, quando se utilizar tipos de células com actividade metabólica intrínseca, a natureza dessa actividade será comprovadamente apropriada à classe química testada.

Condições do ensaio

Utilização de controlos positivos e negativos

Serão incluídos em cada experiência controlos positivos utilizando uma substância com acção directa e uma substância necessitando de activação metabólica; utilizar-se-á igualmente um controlo negativo (veículo).

Podem ser utilizadas como controlos positivos as seguintes substâncias:

— substâncias químicas com acção directa:

  — etilmetanosulfonato,

  — *β*-propiolactona,

— substâncias necessitando de activação metabólica:

  — 2-acetilaminofluoreno,

  — 4-dimetilaminobenzeno,

  — 7,12-dimetilbenzantraceno.

Deverá ser incluído, quando justificado, um controlo positivo suplementar pertencendo à mesma classe química que a substância testada.

Concentrações de exposição

Deverão ser utilizadas várias concentrações das substâncias a testar. Estas concentrações deverão produzir um efeito tóxico dependente da concentração; a concentração máxima deverá produzir uma baixa taxa de sobrevivência, a concentração mínima uma taxa de sobrevivência próxima da observada nos controlos negativos. As substâncias relativamente insolúveis na água serão testadas até ao seu limite de solubilidade com métodos apropriados. No caso de substâncias não tóxicas, francamente solúveis na água, a concentração máxima deverá ser determinada caso a caso.

▼B

Procedimento

As células serão expostas durante um período de tempo dependente do sistema celular utilizado, que pode implicar um novo tratamento acompanhado de mudança de meio (e se necessário uma nova mistura de activação metabólica) se a exposição for prolongada. As células que não tenham actividade metabólica intrínseca suficiente deverão ser expostas à substância a testar na presença e na ausência de um sistema de activação metabólica apropriado. No fim do período de exposição, as células são lavadas de forma a eliminar a substância testada e cultivadas em condições que permitam o aparecimento do fenótipo transformado em estudo sendo então determinada a incidência desta transformação. Todos os resultados deverão ser confirmados por uma experiência independente.

2. **RESULTADOS**

Os resultados deverão ser apresentados em quadros e podem ser apresentados de várias formas consoante o método utilizado, por exemplo, contagem por placa, placas positivas ou número de células transformadas. Quando apropriado, a sobrevivência será expressa em percentagem das taxas de controlo e a frequência de transformação corresponderá ao número de células transformadas por número de sobreviventes. Os resultados deverão ser avaliados com métodos estatísticos apropriados.

3. **RELATÓRIO**

3.1. RELATÓRIO DO TESTE

O relatório do teste deverá incluir as seguintes informações:

— tipo de célula utilizada, número de culturas de células, métodos de manutenção das culturas de células,

— condições do teste: concentração da substância a testar, veículo usado, tempo de incubação, duração e frequência do tratamento, densidade celular durante o tratamento, tipo de sistema exógeno de activação metabólica utilizado, controlos positivos e negativos, especificação do fenótipo estudado, sistema selectivo usado (se apropriado); justificação da escolha das doses,

— método utilizado para contar as células viáveis e as transformadas;

— avaliação estatística,

— discussão dos resultados,

— interpretação dos resultados.

3.2. AVALIAÇÃO E INTERPRETAÇÃO

Ver Introdução Geral, parte B.

4. **REFERÊNCIAS**

Ver Introdução Geral, parte B.

▼M8

B.22. ENSAIO DE LETALIDADE DOMINANTE NO ROEDOR

INTRODUÇÃO

1. O presente método de ensaio é equivalente à *Test Guideline* (TG) 478 (2016) da OCDE. Os métodos de ensaio são revistos periodicamente à luz do progresso científico, das necessidades normativas em evolução e de considerações de bem-estar animal. A presente versão alterada do método de ensaio reflete mais de trinta anos de experiência com este ensaio e o potencial de integração ou de combinação deste ensaio com outros ensaios de toxicidade, como estudos de desenvolvimento, toxicidade reprodutiva ou genotoxicidade; no entanto, devido às suas limitações e à utilização de um grande número de animais, este ensaio não deve ser utilizado como método principal, mas sim como um método de ensaio suplementar, que apenas pode ser utilizado quando não houver alternativa para as exigências normativas. A combinação de ensaios de toxicidade pode poupar um grande número de animais de serem utilizados em ensaios de toxicidade. Está disponível um documento da OCDE que fornece informações sucintas sobre ensaios de toxicologia genética e resume as alterações recentemente introduzidas nas orientações da OCDE neste domínio (1).

2. O objetivo do ensaio de letalidade dominante (DL) consiste em verificar se os produtos químicos produzem mutações resultantes de aberrações cromossómicas nas células germinais. Além disso, o ensaio de letalidade dominante tem importância para a avaliação da genotoxicidade, porquanto, embora possam variar consoante as espécies, os fatores do metabolismo *in vivo*, da farmacocinética e dos processos de reparação do ADN estão ativos e contribuem para a resposta. A indução de uma mutação de DL após exposição ao produto químico em estudo indica que o produto químico afetou o tecido germinal do animal de ensaio.

3. As mutações de DL provocam a morte do embrião ou do feto. A indução da mutação do DL após exposição ao produto químico em estudo indica que o produto químico afetou as células germinais do animal de ensaio.

4. Um ensaio de DL é útil para confirmar os resultados positivos de ensaios com parâmetros somáticos *in vivo* e constitui um parâmetro relevante para a previsão do perigo/risco para o ser humano de doenças genéticas transmitidas através da linha germinal. Contudo, este ensaio requer um grande número de animais e muita mão de obra; por isso, é muito oneroso e demorado. Dado que a frequência espontânea das mutações letais dominantes é bastante elevada, a sensibilidade do ensaio para deteção de ligeiros aumentos da frequência das mutações é geralmente limitada.

5. Os termos-chave são definidos no apêndice 1.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

6. O presente ensaio utiliza, normalmente, ratos (2) (3) (4), mas, em alguns casos, podem ser adequadas outras espécies, como as ratazanas (5) (6) (7) (8), mediante justificação científica. De modo geral, as DL são resultado de aberrações cromossómicas graves (anomalias estruturais e numéricas) (9) (10) (11), mas não podem ser excluídas as mutações génicas. Uma mutação

▼M8

de DL é uma mutação que ocorre numa célula germinal *per se* ou, após a fertilização, nas primeiras fases do desenvolvimento embrionário, não causa lesões no gâmeta, mas é letal para o ovo fecundado ou para o embrião em desenvolvimento.

7. Cada macho é acasalado sequencialmente com fêmeas virgens a intervalos adequados. O número de acasalamentos após tratamento depende do objetivo final do estudo de DL (ponto 23) e deve assegurar que todas as fases da maturação de células germinais masculinas sejam avaliadas para DL (12).

8. Caso existam provas de que o produto químico em estudo ou o(s) seu(s) metabolito(s) não atingem o testículo, o presente ensaio não é apropriado.

PRINCÍPIO DO ENSAIO

9. Em geral, os animais machos são expostos ao produto químico em estudo por uma via de exposição adequada e acasalados com fêmeas virgens não tratadas. Podem ser testados diferentes tipos de células germinais com recurso a intervalos de acasalamento sequenciais. Decorrido um período adequado após o acasalamento, as fêmeas são eutanasiadas e os seus úteros examinados para determinar o número de implantes e de embriões vivos e mortos. A letalidade dominante de um produto químico em estudo é determinada por comparação dos implantes vivos por fêmea do grupo tratado com os implantes vivos por fêmea do grupo de controlo do excipiente/solvente. O aumento do número de implantes mortos por fêmea do grupo tratado em relação ao número de implantes mortos por fêmea do grupo de controlo reflete as perdas após a implantação induzidas pelo produto químico em estudo. Estas perdas são calculadas determinando a proporção de implantes mortos no total de implantes do grupo tratado, comparativamente com a proporção de implantes mortos no total de implantes no grupo de controlo. As perdas antes da implantação podem ser estimadas por comparação dos corpos lúteos menos os implantes totais ou o total de implantes por fêmea do grupo tratado e do grupo de controlo.

VERIFICAÇÃO DA COMPETÊNCIA DO LABORATÓRIO

10. A competência para ensaio deve ser estabelecida mediante a demonstração da capacidade de reproduzir as frequências de letalidade dominante a partir de dados publicados – por exemplo, (13) (14) (15) (16) (17) (18) – com substâncias de controlo positivo (incluindo respostas fracas), como as constantes do quadro 1, e controlos do veículo e a obtenção de frequências de controlo negativas coerentes (ver referências *supra*) ou com o histórico de distribuição do controlo do laboratório, se disponível.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Preparações

Seleção de espécies animais

11. Devem ser utilizados animais saudáveis, das espécies de laboratório mais comuns, que tenham atingido a maturidade sexual. Geralmente são utilizados ratos, embora também possam ser adequadas ratazanas. Pode utilizar-se qualquer outra espécie adequada de mamífero, se o relatório fornecer uma justificação científica.

▼M8

Condições de alojamento e de alimentação dos animais

12. No caso dos roedores, a temperatura do biotério deve ser de 22 °C (±3 °C). Idealmente, a humidade relativa deve estar compreendida entre 50 % e 60 %, embora sejam aceitáveis valores compreendidos entre 40 %, no mínimo, e um valor máximo que, de preferência, não deve exceder 70 %, salvo durante os períodos de limpeza do biotério. A iluminação deve ser artificial, com uma alternância de 12 horas de luz e 12 horas de obscuridade. Para a alimentação, podem ser usadas dietas convencionais de laboratório, com acesso ilimitado a água potável. Se o produto químico em estudo for administrado pela alimentação, a escolha da dieta poderá ser condicionada pela necessidade de assegurar a dosagem adequada. Antes do tratamento ou do acasalamento, os roedores devem ser alojados em pequenos grupos (não mais de cinco) do mesmo sexo – caso não se prevejam ou observem comportamentos agressivos –, de preferência em gaiolas sólidas com um enriquecimento ambiental adequado. Os animais podem ser alojados individualmente se tal se justificar do ponto de vista científico.

Preparação dos animais

13. Distribuem-se aleatoriamente animais saudáveis e sexualmente maduros, machos e fêmeas, pelos grupos de controlo e pelos grupos expostos. Os animais são identificados de forma inequívoca, utilizando um método humano minimamente invasivo (p. ex., anilhagem, marcação, *microchip* ou identificação biométrica, mas não entalhe de orelhas nem amputação de falanges), e são aclimatados às condições de laboratório durante, pelo menos, cinco dias. As gaiolas devem estar dispostas de forma a minimizar possíveis efeitos derivados do seu posicionamento. Devem ser evitadas contaminações cruzadas pelo produto químico de controlo positivo e pelo produto químico em estudo. No início do estudo, a diferença de peso entre os animais deve ser mínima e não deve exceder ±20 % do peso médio de cada sexo.

Preparação das doses

14. Os produtos químicos em estudo na forma sólida devem ser dissolvidos ou suspensos em solventes ou veículos adequados, ou misturados na dieta ou na água potável antes da administração aos animais. Os produtos químicos em estudo no estado líquido podem ser adicionados diretamente aos sistemas em estudo e/ou diluídos antes da administração. No caso das exposições por inalação, os produtos químicos em estudo podem ser administrados sob a forma de gás, vapor ou aerossol sólido/líquido, consoante as respetivas propriedades físico-químicas. Devem utilizar-se preparações frescas do produto químico em estudo, a menos que os dados de estabilidade demonstrem que o mesmo pode ser armazenado e determinem as condições de armazenagem adequadas.

Condições de ensaio

Solvente/veículo

15. O solvente/veículo não deve produzir efeitos tóxicos nos volumes utilizados e não devem existir indícios de reação química com o produto químico em estudo. A eventual utilização de solventes/veículos menos habituais deve ser fundamentada por dados de referência que indiquem serem compatíveis. Sempre que possível, recomenda-se a utilização de um solvente/veículo aquoso. A água, o soro fisiológico, uma solução de metilcelulose, uma solução de sal de sódio de carboximetilcelulose, o azeite e o óleo de milho constituem exemplos de solventes/veículos compatíveis de utilização comum.

Amostras de controlo positivo

16. Devem ser sempre utilizados animais de controlo positivo em paralelo, a menos que o laboratório tenha demonstrado competência na realização do ensaio e o tenha utilizado regularmente no passado recente (nos últimos 5 anos, por exemplo). Não é, contudo, necessário tratar os animais de controlo positivo pela mesma via que os animais que recebem o produto químico em estudo, nem colher amostras em todos os intervalos de acasalamento. As

▼M8

substâncias de controlo positivo devem ser comprovadamente produtoras de DL nas condições utilizadas para o ensaio. Salvo para o tratamento, os animais dos grupos de controlo devem ser alvo dos mesmos procedimentos que os animais dos grupos tratados.

17. As doses das substâncias de controlo positivo devem ser determinadas de modo a produzirem efeitos fracos ou moderados que avaliem criticamente o desempenho e a sensibilidade do ensaio, mas a produzirem, de forma consistente, efeitos letais dominantes positivos. O quadro 1 apresenta exemplos de substâncias de controlo positivo e de dosagens adequadas.

Quadro 1

Exemplos de substâncias de controlo positivo

Substância [n.º CAS] (número de referência)	Gama de doses eficazes (mg/kg) (espécies de roedores)	Período de administração (dias)
Trietilenomelamina [51-18-3] (15)	0,25 (ratos)	1
Ciclofosfamida [50-18-0] (19)	50-150 (ratos)	5
Ciclofosfamida [50-18-0] (5)	25-100 (ratazanas)	1
Metanossulfonato de etilo [62-50-0] (13)	100-300 (ratos)	5
Acrilamida monómera [79-06-1] (17)	50 (ratos)	5
Clorambucil [305-03-3] (14)	25 (ratos)	1

Controlos negativos

18. Cada amostragem deve incluir animais de controlo negativo, tratados apenas com solvente ou veículo e, em todos os outros aspetos, sujeitos ao mesmo procedimento que os grupos de tratamento (20). Na ausência de dados de controlo históricos ou publicados que demonstrem que o solvente/veículo escolhido não induz DL nem qualquer outro efeito prejudicial, todas as amostragens devem incluir igualmente animais de controlo sem tratamento, de modo a estabelecer a aceitabilidade do controlo do veículo.

PROCEDIMENTO

Número de animais

19. Cada macho é acasalado sequencialmente, a intervalos adequados previamente determinados (por exemplo, semanais, pontos 21 e 23), de preferência com uma fêmea virgem. O número de machos por grupo deve ser predeterminado de forma a ser suficiente (em combinação com o número de fêmeas acasaladas a cada intervalo de acasalamento) para assegurar a representatividade estatística necessária para detetar pelo menos uma duplicação na frequência de DL (ponto 44).

20. O número de fêmeas por intervalo de acasalamento deve também ser predeterminado pelos cálculos de representatividade estatística de modo de permitir a deteção de, pelo menos, uma duplicação na frequência de DL (ou seja, fêmeas prenhes em número suficiente para a obtenção de, pelo menos, 400 implantes totais) (20) (21) (22) (23) e a probabilidade de, pelo menos, um implante morto por unidade de análise (ou seja, o grupo de acasalamento por dose) (24).

▼M8

Período de administração e intervalo de acasalamento

21. O número de intervalos de acasalamento após o tratamento é determinado pelo calendário deste e deve assegurar que todas as fases da maturação de células germinais masculinas são avaliadas para indução de DL (12) (25). No caso de um tratamento único com, no máximo, cinco administrações de doses diárias, devem realizar-se, após a última destas, acasalamentos de 8 ratos ou 10 ratazanas com intervalos semanais. Em caso de administração de doses múltiplas, o número de intervalos de acasalamento pode ser reduzido proporcionalmente ao aumento do período de administração, mas deve manter-se o objetivo de avaliar todas as fases da espermatogénese (por exemplo, após uma exposição de 28 dias, quatro acasalamentos semanais são suficientes para avaliar todas as fases da espermatogénese no rato). Todos os calendários de tratamento e acasalamento devem ser cientificamente justificados.

22. As fêmeas devem permanecer com os machos durante, pelo menos, um ciclo éstrico (por exemplo, uma semana abrange um ciclo éstrico em ratos e em ratazanas). As fêmeas que não tenham acasalado durante um intervalo de uma semana podem ser utilizadas para um intervalo de acasalamento subsequente. Em alternativa, até à ocorrência do acasalamento, comprovado pela presença de esperma na vagina ou pela presença de um rolhão vaginal.

23. A exposição e o regime de acasalamento utilizados são função do objetivo último do estudo de DL. Se o objetivo for determinar se um determinado produto químico induz mutações de DL *per se*, o método deve consistir em expor todo um ciclo de espermatogénese (p. ex., 7 semanas no rato, 5-7 tratamentos por semana) e acasalar no final. Contudo, se o objetivo for identificar o tipo de células germinais sensíveis para indução de DL, é preferível uma exposição única ou uma exposição de 5 dias, seguida de acasalamento semanal.

Doses

24. Se for realizado um estudo preliminar para avaliação da gama de doses a administrar por não estarem disponíveis dados apropriados de apoio à seleção de doses, esse estudo deve ser efetuado no mesmo laboratório, utilizando a mesma espécie, a mesma linha celular, o mesmo sexo e o mesmo regime de exposição do estudo principal (26). O estudo deve procurar identificar a dose máxima tolerável (DMT), definida como a dose mais elevada tolerada, durante o período de ensaio, sem sinais de toxicidade limitativa do estudo (p. ex., comportamentos ou reações anormais, ligeira redução do peso corporal ou citotoxicidade no sistema hematopoiético) e sem causar a morte nem sinais de dor, sofrimento ou tensão que levem à eutanásia por meios humanos (27).

25. A DMT também não deve afetar negativamente o êxito do acasalamento (21).

26. Os produtos químicos em estudo com atividade biológica específica em doses baixas não tóxicas (como hormonas e agentes mitogénicos) e os produtos químicos que apresentem saturação de propriedades toxicocinéticas podem ser exceções aos critérios de definição da dosagem e devem ser avaliados caso a caso.

27. Para obter informações sobre a resposta às doses, o estudo completo deve incluir um grupo de controlo negativo e, no mínimo, três níveis de dosagem, separadas por um fator que, em geral, é 2 e não pode ser superior a 4. Se o produto químico em estudo não produzir efeitos tóxicos num estudo de avaliação da gama de doses ou com base em dados existentes, a dose mais elevada administrada de uma só vez deve ser de 2 000 mg/kg de peso corporal. Se o produto químico em estudo gerar toxicidade, a dose máxima administrada deve ser a DMT e as doses utilizadas devem, de

▼M8

preferência, abranger uma gama compreendida entre a dose máxima e uma dose de toxicidade baixa ou nula. No caso de produtos químicos não tóxicos, a dose máxima para um período de administração igual ou superior a 14 dias é de 1 000 mg/kg de peso corporal/dia e, para um período de administração inferior a 14 dias, a dose máxima é de 2 000 mg/kg de peso corporal/dia.

Administração das doses

28. Na conceção de um ensaio, deve ter-se em mente a via prevista de exposição humana. Por conseguinte, desde que devidamente justificadas, podem escolher-se, por exemplo, vias de exposição como a alimentação, água de beber, subcutânea, intravenosa, tópica, inalação, oral (por gavagem) ou implantação. Seja qualquer for, a via escolhida deve garantir a exposição adequada do(s) tecido(s)-alvo. A injeção intraperitoneal não é, em geral, recomendada, uma vez que não se trata de uma via previsível de exposição humana, só devendo utilizar-se com justificação científica específica. Se o produto químico em estudo for misturado nos alimentos ou na água de beber, especialmente no caso de uma dose única, deve prever-se, entre o consumo dos alimentos e da água e o acasalamento, um intervalo suficiente para permitir a deteção dos efeitos (ponto 31). O volume máximo de líquido que pode ser administrado de uma só vez por gavagem ou injeção depende do tamanho do animal de ensaio, não devendo exceder 1 ml/100 g de peso corporal, exceto no que respeita a soluções aquosas, em que pode ser administrado um máximo de 2 ml/100 g de peso corporal. A utilização de volumes maiores (caso seja permitida pela legislação no domínio do bem-estar dos animais) deve ser justificada. As variações no volume de ensaio devem ser minimizadas mediante o ajustamento da concentração, de modo a assegurar um volume constante em relação ao peso corporal em todas as dosagens.

Observações

29. Os animais de ensaio devem ser sujeitos a exames clínicos gerais, registando-se os sinais clínicos observados pelo menos uma vez por dia, de preferência à(s) mesma(s) hora(s) todos os dias e tendo em conta o período de pico dos efeitos previstos após a exposição. Durante o período de exposição, devem observar-se todos os animais pelo menos duas vezes por dia, para a deteção de sinais de morbilidade e mortalidade. Todos os animais devem ser pesados no início do estudo e, pelo menos, uma vez por semana nos estudos com repetição de dose, bem como aquando da eutanásia. Pelo menos uma vez por semana, devem realizar-se medições do consumo de alimentos. Se o produto químico em estudo for administrado através da água de beber, o consumo desta deve ser medido em cada mudança de água e, pelo menos, uma vez por semana. Os animais que exibam indicadores não letais de toxicidade excessiva devem ser eutanasiados antes da conclusão do período de ensaio (27).

Colheita e tratamento de tecidos

30. As fêmeas são eutanasiadas na segunda metade da gravidez, no dia da gestação (GD) 13 no caso dos ratos e no GD 14-15 no caso das ratazanas. Os úteros são examinados para deteção de efeitos letais dominantes, a fim de determinar o número de implantes, de embriões vivos e mortos e de corpos lúteos.

31. Os cornos uterinos e os ovários são expostos para contagem dos corpos lúteos e os fetos são removidos, contados e pesados. Os úteros devem ser examinados para detetar reabsorções ocultas por fetos vivos e para garantir que todas as reabsorções são enumeradas. É registada a mortalidade fetal. É igualmente registado o número de fêmeas prenhes e o número total de implantações, as perdas antes da implantação e a mortalidade após a

▼M8

implantação (incluindo as reabsorções precoces e tardias). Além disso, os fetos visíveis podem ser conservados no fixador de Bouin durante, pelo menos, 2 semanas, após o que são examinados para deteção de malformações externas graves (28), a fim de se obterem informações adicionais sobre os efeitos sobre a reprodução e o desenvolvimento do agente em estudo.

DADOS E RELATÓRIOS

Tratamento dos resultados

32. Os resultados devem ser apresentados em quadros que indiquem o número de machos acasalados, o número de fêmeas prenhes e o número de fêmeas não prenhes. Os resultados de cada acasalamento, incluindo a identidade de cada macho e de cada fêmea, são apresentados individualmente. Deve especificar-se, para cada fêmea, o intervalo de acasalamento, a dose dos machos tratados e o número de implantes vivos e implantes mortos.

33. As perdas após a implantação são calculadas determinando a proporção de implantes mortos no total de implantes do grupo tratado, comparativamente com a proporção de implantes mortos no total de implantes no grupo de controlo de veículos/solventes.

34. As perdas antes da implantação são calculadas como a diferença entre o número de corpos lúteos e o número de implantes ou como a diminuição do número médio de implantes por fêmea em relação ao dos acasalamentos de controlo. Se forem avaliadas as perdas antes da implantação, devem apresentar-se os resultados.

35. O fator de letalidade dominante é estimado do seguinte modo: (mortes após a implantação/total de implantações por fêmea) × 100.

36. Devem ser comunicados os dados relativos à toxicidade e aos sinais clínicos, em conformidade com o ponto 29.

Critérios de aceitabilidade

37. A aceitabilidade de um ensaio é determinada pelos critérios a seguir enunciados.

— O controlo negativo em paralelo está de acordo com as normas publicadas para os dados históricos de controlo negativo, bem como com os dados históricos de controlo do laboratório, se disponíveis (ver pontos 10 e 18).

— Os controlos positivos realizados em paralelo induzem respostas coerentes com as normas publicadas relativas a dados históricos de controlo positivo ou com a base de dados históricos de controlo positivo do laboratório, se disponíveis, e produzem um aumento estatisticamente significativo em relação ao controlo negativo (ver pontos 17 e 18).

— Foi analisado um número total adequado de implantes e de doses (ponto 20).

— Os critérios de seleção da dose máxima são coerentes com os descritos nos pontos 24 e 27.

Avaliação e interpretação dos resultados

38. Devem ser analisados pelo menos três grupos tratados, de modo a proporcionar dados suficientes para uma análise da resposta à dosagem.

▼**M8**

39. Se forem cumpridos todos os critérios de aceitabilidade, o produto químico em estudo é considerado inequivocamente positivo se:

— pelo menos uma das doses de ensaio apresentar um aumento estatisticamente significativo em relação ao controlo negativo;

— o aumento, avaliado com um ensaio adequado, estiver relacionado com a dose em, pelo menos, uma condição experimental (por exemplo, um intervalo de acasalamento semanal);

— nenhum dos resultados estiver fora da gama aceitável de dados de controlo negativo ou da distribuição dos dados históricos de controlo negativo do laboratório (por exemplo, limites de controlo de 95 % com base numa distribuição de Poisson), se disponível.

Nesse caso, o produto químico em estudo é considerado passível de induzir mutações letais dominantes em células germinais dos animais de ensaio. O ponto 44 contém recomendações sobre os métodos estatísticos mais adequados; as referências bibliográficas (20) (21) (22) (24) (29) contêm outras recomendações sobre abordagens estatísticas. Nos testes estatísticos utilizados, um animal deve considerar-se a unidade experimental.

40. Se forem cumpridos todos os critérios de aceitabilidade, o produto químico em estudo é considerado inequivocamente negativo se:

— nenhuma das doses de ensaio apresentar um aumento estatisticamente significativo em relação ao controlo negativo;

— não se observar qualquer aumento relacionado com a doses em nenhuma condição experimental;

— todos os resultados estiverem dentro da gama aceitável de dados de controlo negativo ou dos dados históricos de controlo negativo do laboratório (por exemplo, limites de controlo de 95 % com base numa distribuição de Poisson), se disponíveis.

Nesse caso, o produto químico em estudo não é considerado passível de induzir mutações letais dominantes em células germinais dos animais de ensaio.

41. As respostas inequivocamente positivas ou inequivocamente negativas não carecem de confirmação.

42. Se a resposta não for inequivocamente negativa nem positiva, e a fim de contribuir para o estabelecimento da relevância biológica de um resultado (por exemplo, um aumento ténue ou no limite), os dados devem ser avaliados por peritos e/ou através de estudos complementares que utilizem os dados experimentais existentes, para determinar, nomeadamente, se o resultado positivo está fora da gama aceitável de dados de controlo negativo ou dos dados históricos de controlo negativo do laboratório (30).

43. Em casos raros, mesmo após estudos complementares, os dados obtidos não permitem concluir um resultado positivo ou negativo, pelo que se considera que o resultado é ambíguo.

44. Os testes estatísticos utilizados devem considerar o animal macho como a unidade experimental. Embora seja possível que os dados relativos à contagem (por exemplo, o número de implantes por fêmea) possam ser objeto de uma distribuição de Poisson e/ou certas proporções (p. ex., proporção de implantes mortos) possam ser distribuídas de forma binomial, é muito frequente os dados encontrarem-se dispersos (31). Por conseguinte, a análise estatística deve começar por efetuar um teste de sobredispersão/subdispersão com recurso a testes de variância, como o teste de variância binomial de Cochran (32) ou o teste C(α) de Tarone para a sobredispersão binomial (31) (33). Se não for detetada qualquer desvio em relação à dispersão binomial, as tendências das proporções das dosagens podem ser testadas utilizando o teste

▼M8

de tendência de Cochran-Armitage (34) e a comparação entre pares com o grupo de controlo pode ser testada com o teste exato de Fisher (35). Do mesmo modo, se se detetar qualquer desvio em relação à dispersão de Poisson, as tendências das contagens podem ser testadas utilizando o teste de regressão de Poisson (36) e as comparações par a par com o grupo de controlo podem ser testadas no contexto do modelo de Poisson, utilizando contrastes par a par (36). Se for detetada sobredispersão ou subdispersão significativa, recomenda-se a utilização de métodos não paramétricos (23) (31). Estes métodos incluem testes de base, como o teste de tendências de Jonckheere-Terpstra (37) e o teste de Mann-Whitney (38) para comparações par a par com o grupo de controlo de veículos/solventes, bem como testes de permutação, reamostragem ou *bootstrap* para tendências e comparações par a par com o grupo de controlo (31) (39).

45. Um ensaio de DL positivo fornece provas da genotoxicidade do produto químico em estudo nas células germinais do macho tratado da espécie de ensaio.

46. A averiguação do facto de os valores observados estarem dentro ou fora da faixa de controlo histórico pode fornecer orientações para a avaliação da significância biológica da resposta (40).

Relatório de ensaio

47. O relatório de ensaio deve incluir as seguintes informações:

Síntese.

Produto químico em estudo:

— origem, número de lote e data-limite de utilização, se conhecidos;

— estabilidade, se conhecida;

— solubilidade e estabilidade no solvente, se conhecidas;

— medição do pH, da pressão osmótica e da quantidade de precipitado no meio de cultura ao qual foi adicionado o produto químico em estudo, consoante o caso.

Substância monocomponente:

— aspeto físico, hidrossolubilidade e outras propriedades físico-químicas pertinentes;

— dados de identificação química, como as denominações IUPAC ou CAS, número CAS, código SMILES ou InChI, fórmula estrutural, pureza, identidade química de impurezas, caso se justifique e seja exequível, etc.

Substância multicomponentes, UVCB e misturas:

— caracterizada, na medida do possível, pela identidade química (ver acima), pela ocorrência quantitativa e pelas principais propriedades físico-químicas dos componentes.

Preparação do produto químico em estudo:

— justificação da escolha do veículo;

— solubilidade e estabilidade do produto químico em estudo no solvente/ /veículo, se conhecidas;

▼**M8**

— preparação de fórmulas alimentares, na água de beber ou inaláveis;

— determinações analíticas (eventualmente) realizadas a essas fórmulas (por exemplo: estabilidade, homogeneidade, concentrações nominais).

Animais utilizados no ensaio:

— espécie/estirpe utilizada e justificação da escolha;

— número, idade e sexo dos animais;

— proveniência, condições de alojamento, alimentação, etc.;

— método de identificação unívoca dos animais;

— para estudos de curta duração: peso individual dos animais machos no início e no final do teste; para estudos de duração superior a uma semana: os pesos durante o estudo e o consumo alimentar. Deve incluir-se, relativamente a cada grupo, a gama de pesos corporais, com a respetiva média e o desvio-padrão.

Condições de realização do ensaio:

— controlos positivos e negativos (veículo/solvente);

— dados do estudo de determinação da gama de dosagem;

— fundamentação da escolha das doses;

— detalhes da preparação do produto químico em estudo;

— elementos relativos à administração do produto químico em estudo;

— justificação da via de administração escolhida;

— métodos de medição da toxicidade para os animais, incluindo, sempre que disponíveis, análises histopatológicas ou hematológicas e a frequência com que foram realizadas observações dos animais e dos respetivos pesos corporais;

— métodos para verificar se o produto químico em estudo atingiu o tecido-alvo ou a circulação geral, caso se obtenham resultados negativos;

— dose real (mg/kg de peso corporal/dia), calculada a partir da concentração do produto químico em estudo nos alimentos ou na água de beber (ppm) e do consumo, se aplicável;

— elementos relativos à qualidade dos alimentos e da água;

— elementos relativos ao enriquecimento ambiental da gaiola;

— descrição detalhada da exposição e do programa de colheita de amostras e justificação das escolhas feitas;

— método de analgesia;

— método de eutanásia;

▼**M8**

— procedimentos para o isolamento e a preservação de tecidos;

— proveniência e números de lote de todos os *kits* e reagentes (quando aplicável);

— métodos de enumeração de DL;

— calendário de acasalamento;

— métodos utilizados para comprovar o acasalamento;

— momento da eutanásia;

— critérios para a contagem dos efeitos de DL incluindo os corpos lúteos, as implantações, as reabsorções as perdas antes da implantação, os implantes vivos e os implantes mortos.

Resultados:

— estado dos animais antes e durante o período de ensaio, incluindo sinais de toxicidade;

— peso corporal dos machos durante o tratamento e os períodos de acasalamento;

— número de fêmeas acasaladas;

— relação dose-resposta, se possível;

— dados históricos e simultâneos sobre o controlo negativo, com as respectivas gama, valor médio e desvio-padrão;

— dados sobre o controlo positivo simultâneo;

— dados apresentados em quadro para cada mãe, incluindo: número de corpos lúteos por mãe, número de implantações por mãe, número de reabsorções e de perdas antes da implantação, número de implantes vivos por mãe, número de implantes mortos por mãe, peso dos fetos;

— os dados supramencionados relativamente a cada período de acasalamento e a cada dose, com frequências de DL;

— métodos estatísticos utilizados e análises estatísticas efetuadas.

Discussão dos resultados.

Conclusão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(1) OCDE (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No 234, OECD, Paris.

(2) Bateman, A.J. (1977). The Dominant Lethal Assay in the Male Mouse, in Handbook of Mutagenicity Test Procedures B.J. Kilbey *et. al.* (Eds.) pp. 235-334, Elsevier, Amsterdam

(3) Ehling U.H., Ehling, U.H., Machemer, L., Buselmaier, E., Dycka, D., Frohberg, H., Kratochvilova, J., Lang, R., Lorke, D., Muller, D., Pheh, J., Rohrborn, G., Roll, R., Schulze-Schencking, M., and Wiemann, H. (1978). Standard Protocol for the Dominant Lethal Test on Male Mice. Set up by the Work Group «Dominant» lethal mutations of the ad hoc Committee Chemogenetics, Arch. *Toxicol., 39*, 173-185

▼**M8**

(4) Shelby M.D. (1996). Selecting Chemicals and Assays for Assessing Mammalian Germ Cell Mutagenicity. Mutation Res,. 352:159-167.

(5) Knudsen I., Knudsen, I., Hansen, E.V., Meyer, O.A. and Poulsen, E. (1977). A proposed Method for the Simultaneous Detection of Germ-Cell Mutations Leading to Fetal Death (Dominant Lethality) and of Malformations (Male Teratogenicity) in Mammals. Mutation Res., 48:267-270.

(6) Anderson D., Hughes, J.A., Edwards, A.J. and Brinkworth, M.H. (1998). A Comparison of Male-Mediated Effects in Rats and Mice Exposed to 1,3-Butadiene. Mutation Res., 397:77-74.

(7) Shively C.A., C.A., White, D.M., Blauch, J.L. and Tarka, S.M. Jr. (1984). Dominant Lethal Testing of Theobromine in Rats. *Toxicol.* Lett. 20:325-329.

(8) Rao K.S., Cobel-Geard, S.R., Young, J.T., Hanley, T.R. Jr., Hayes, W.C., John, J.A. and Miller, R.R. (1983). Ethyl Glycol Monomethyl Ether II. Reproductive and dominant Lethal Studies in Rats. Fundam. Appl. *Toxicol*., 3:80-85.

(9) Brewen J.G., Payne, H.S., Jones, K.P., and Preston, R.J. (1975). Studies on Chemically Induced Dominant Lethality. I. The Cytogenetic Basis of MMS-Induced Dominant Lethality in Post-Meiotic Male Germ Cells, Mutation Res., 33, 239-249.

(10) Marchetti F., Bishop, J.B., Cosentino, L., Moore II, D. and Wyrobek, A.J. (2004). Paternally Transmitted Chromosomal Aberrations in Mouse Zygotes Determine their Embryonic Fate. Biol. Reprod., 70:616-624.

(11) Marchetti F. and Wyrobek, A.J. (2005). Mechanisms and Consequences of Paternally Transmitted Chromosomal Aberrations. Birth Defects Res., C 75:112-129.

(12) Adler I.D. (1996). Comparison of the Duration of Spermatogenesis Between Rodents and Humans. Mutation Res., 352:169-172.

(13) Favor J., and Crenshaw J.W. (1978). EMS-Induced Dominant Lethal Dose Response Curve in DBA/1J Male Mice, Mutation Res., 53: 21-27.

(14) Generoso W.M., Witt, K.L., Cain, K.T., Hughes, L. Cacheiro, N.L.A, Lockhart, A.M.C. and Shelby, M.D. (1995). Dominant Lethal and Heritable Translocation Test with Chlorambucil and Melphalan. Mutation Res., 345:167-180.

(15) Hastings S.E., Huffman K.W. and Gallo M.A. (1976). The dominant Lethal Effect of Dietary Triethylenemelamine, Mutation Res., 40:371-378.

(16) James D.A. and Smith D.M. (1982). Analysis of Results from a Collaborative Study of the Dominant Lethal Assay, Mutation Res., 99:303-314.

(17) Shelby M.D., Cain, K.T., Hughes, L.A., Braden, P.W. and Generoso, W.M. (1986). Dominant Lethal Effects of Acrylamide in Male Mice. Mutation Res., 173:35-40.

▼**M8**

(18) Sudman P.D., Rutledge, J.C., Bishop, J.B. and Generoso W.M. (1992). Bleomycin: Female-Specific Dominant Lethal Effects in Mice, Mutation Res., 296: 143-156.

(19) Holstrom L.M., Palmer A.K. and Favor, J. (1993). The Rodent Dominant Lethal Assay. In Supplementary Mutagenicity Tests. Kirkland D.J. and Fox M. (Eds.), Cambridge University Press, pp. 129-156.

(20) Adler I-D., Bootman, J., Favor, J., Hook, G., Schriever-Schwemmer, G., Welzl, G., Whorton, E., Yoshimura, I. and Hayashi, M. (1998). Recommendations for Statistical Designs of *In Vivo* Mutagenicity Tests with Regard to Subsequent Statistical Analysis, Mutation Res., 417:19–30.

(21) Adler I.D., Shelby M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and Tanaka N. (1994). International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests. Mutation Res., 312:313-318.

(22) Generoso W.M. and Piegorsch W.W. (1993). Dominant Lethal Tests in Male and Female Mice. Methods, *Toxicol*., 3A:124-141.

(23) Haseman J.K. and Soares E.R. (1976).The Distribution of Fetal Death in Control Mice and its Implications on Statistical Tests for Dominant Lethal Effects. Mutation. Res., 41: 277-288.

(24) Whorton E.B. Jr. (1981). Parametric Statistical Methods and Sample Size Considerations for Dominant Lethal Experiments. The Use of Clustering to Achieve Approximate Normality, Teratogen. Carcinogen. *Mutagen*., 1:353 – 360.

(25) Anderson D., Anderson, D., Hodge, M.C.E., Palmer, S., and Purchase, I.F.H. (1981). Comparison of Dominant Lethal and Heritable Translocation Methodologies. Mutation. Res., 85:417-429.

(26) Fielder R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose Setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. Mutagen., 7:313-319.

(27) OCDE (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No.19.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(28) Barrow M.V., Taylor W.J and Morphol J. (1969). A Rapid Method for Detecting Malformations in Rat Fetuses, 127, 291–306.

(29) Kirkland D.J., (Ed.)(1989). Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Cambridge University Press.

(30) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper P., Lovell D., Martus H.-J. and Thybaud V. (2011). «Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data», Mutation. Res., 723:87-90.

(31) Lockhart A.C., Piegorsch W.W. and Bishop J.B. (1992). Assessing Over Dispersion and Dose-Response in the Male Dominant Lethal Assay. Mutation. Res., 272:35-58.

(32) Cochran W.G. (1954). Some Methods for Strengthening the Common χ^2 Tests. Biometrics, 10: 417-451.

▼**M8**

(33) Tarone R.E. (1979). Testing the Goodness of Fit of the Binomial Distribution. *Biometrika*, 66: 585-590.

(34) Margolin B.H. (1988). Test for Trend in Proportions. In *Encyclopedia of* Statistical Sciences, Volume 9, Kotz S. and Johnson N. L. (Eds.), pp. 334-336. John Wiley and Sons, New York.

(35) Cox D.R., Analysis of Binary Data. Chapman and Hall, London (1970).

(36) Neter J.M., Kutner, H.C., Nachtsheim, J. and Wasserman, W. (1996). Applied Linear Statistical Models, Fourth Edition, Chapters 14 and 17. McGraw-Hill, Boston

(37) Jonckheere R. (1954). A Distribution-Free K-Sample Test Against Ordered Alternatives. *Biometrika,* 41:133-145.

(38) Conover W.J. (1971). Practical Nonparametric Statistics. John Wiley and Sons, New York

(39) Efron, B. (1982). The Jackknife, the Bootstrap and Other Resampling Plans. Society for Industrial and Applied Mathematics, Philadelphia, PA.

(40) Fleiss J. (1973). Statistical Methods for Rates and Proportions. John Wiley and Sons, New York.

▼**M8**

Apêndice 1

DEFINIÇÕES

Corpo lúteo: estrutura secretora de hormonas que se forma no ovário, num folículo que libertou um óvulo. O número de corpos lúteos nos ovários corresponde ao número de óvulos libertados.

Intervalo de acasalamento: período transcorrido entre o final da exposição e o acasalamento dos machos tratados. Através do controlo deste intervalo é possível avaliar os efeitos químicos nos diferentes tipos de células germinais. Nos ratos que acasalam durante a 1.ª, 2.ª, 3.ª, 4.ª, 5.ª, 6.ª, 7.ª e 8.ª semanas após o final da exposição, mede os efeitos nos espermatozoides, espermatídios condensados, espermatídios redondos, espermatócitos paquítenos, espermatócitos precoces, espermatogónias diferenciadas, espermatogónias diferenciadoras, e células espermatogónias estaminais.

Mutação letal dominante: mutação que ocorre numa célula germinal ou se fixa após a fertilização e que provoca a morte do embrião ou do feto.

Perdas antes da implantação: diferença entre o número de implantes e o número de corpos lúteos. As perdas antes da implantação podem ser estimadas comparando o número total de implantes por fêmea no grupo tratado e no grupo de controlo.

Perdas após a implantação: proporção de implantes mortos no grupo tratado comparativamente com a proporção de implantes mortos no total dos implantes no grupo de controlo.

Produto químico: uma substância ou mistura

Produto químico em estudo: qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado o presente método de ensaio.

Taxa de fecundidade: relação entre o número de fêmeas que acasalaram e engravidaram e o número de fêmeas que acasalaram.

UVCB: substâncias químicas de composição desconhecida ou variável, produtos de reação complexos e materiais biológicos.

▼**M8**

Apêndice 2

OPORTUNIDADE DA ESPERMATOGÉNESE NOS MAMÍFEROS

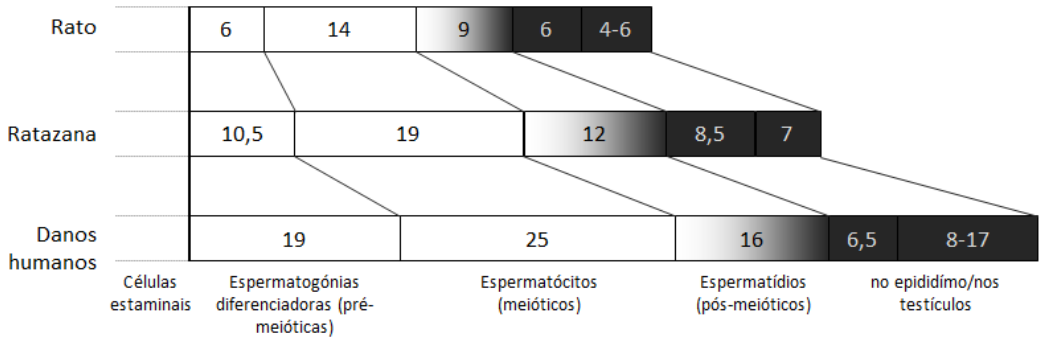


Fig.1: Comparação da duração (dias) do desenvolvimento de células germinais masculinas em ratos, ratazanas e seres humanos. A reparação do ADN não ocorre durante os períodos indicados pelo sombreado.

É apresentado um esquema de espermatogénese nos ratos, ratazanas e seres humanos (extraído de Adler, 1996). As espermatogónias indiferenciadas incluem: espermatogónia A-simples, A-emparelhada e A-alinhada (Hess e de Franca, 2008). As A-simples são consideradas as verdadeiras células estaminais; portanto, para avaliar os efeitos nas células estaminais, devem transcorrer pelo menos 49 dias (no rato) entre a última injeção do produto químico em estudo e o acasalamento.

Referências

Adler, ID (1996). Comparison of the duration of spermatogenesis between rodents and humans. Mutat Res, 352:169-172.

Hess, RA, De Franca LR (2008). Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. In: Molecular Mechanisms in Spermatogenesis, C. Yan Cheng (Ed), Landes Biosciences and Springer Science&Business Media:1-15.

▼M8

B.23. ENSAIO DE ABERRAÇÕES CROMOSSÓMICAS EM ESPERMATOGÓNIAS DE MAMÍFERO

INTRODUÇÃO

1. O presente método de ensaio é equivalente à *Test Guideline* 483 (2016) da OCDE. Os métodos de ensaio são revistos periodicamente à luz do progresso científico, das necessidades normativas em evolução e de considerações de bem-estar animal. A presente versão alterada do método de ensaio reflete muitos anos de experiência com este ensaio e o potencial de integração ou de combinação deste ensaio com outros estudos de toxicidade ou genotoxicidade. A combinação de estudos de toxicidade tem potencial para reduzir o número de animais utilizados em ensaios de toxicidade. O presente método faz parte de uma série de métodos de ensaio no domínio da toxicologia genética. Está disponível um documento da OCDE que fornece informações sucintas sobre ensaios de toxicologia genética e resume as alterações recentemente introduzidas nas orientações da OCDE neste domínio (1).

2. O objetivo do ensaio *in vivo* de aberrações cromossómicas em espermatogónias de mamífero consiste em identificar os produtos químicos que causam aberrações cromossómicas estruturais nas células espermatogónias de mamíferos (2) (3) (4). Além disso, o presente ensaio é relevante para a avaliação da genotoxicidade, porquanto, embora possam variar consoante as espécies, os fatores do metabolismo *in vivo*, da farmacocinética e dos processos de reparação do ADN estão ativos e contribuem para a resposta. O método do presente ensaio não foi concebido para medir aberrações numéricas e não é normalmente utilizado para esse efeito.

3. O presente ensaio mede aberrações cromossómicas estruturais (tanto cromossómicas como cromatídicas) na divisão das células germinais espermatogónias e, por conseguinte, pressupõe-se que tenha um caráter de previsão da indução de mutações hereditárias nas células germinais.

4. Os termos-chave encontram-se definidos no apêndice.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

5. O presente ensaio utiliza normalmente roedores mas, em alguns casos, podem ser adequadas outras espécies, mediante justificação científica. As preparações citogenéticas normais dos ensaios com roedores geram metáfases mitóticas (espermatogónias) e meióticas (espermatócitos). As metáfases mitóticas e meióticas são identificadas com base na morfologia dos cromossomas (4). O ensaio citogenético *in vivo* deteta aberrações cromossómicas estruturais nas mitoses espermatogónias. O presente método de ensaio visa outros tipos de células.

6. Para detetar aberrações cromatídicas em células espermatogónias deve examinar-se a primeira divisão mitótica da célula após a exposição, antes de estas aberrações se converterem em aberrações cromossómicas nas divisões celulares subsequentes. Podem obter-se informações adicionais sobre os espermatócitos expostos através da análise cromossómica dos cromossomas meióticos para deteção de aberrações cromossómicas estruturais nas metáfases I e II da diacinese.

▼M8

7. Nos testículos estão presentes várias gerações de espermatogónias (5), e estes diferentes tipos de células germinais podem ter diferentes sensibilidades ao tratamento químico. Logo, as aberrações detetadas representam uma resposta agregada das várias populações de células espermatogónias expostas. A maioria das células mitóticas nos preparativos do testículo são espermatogónias de tipo B, que têm um ciclo celular de aproximadamente 26 horas (3).

8. O presente ensaio não é apropriado caso existam provas de que o produto químico em estudo ou o(s) seu(s) metabolito(s) não atingem o testículo.

PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

9. Por norma, os animais são expostos ao produto químico em estudo através de um modo de exposição apropriado. Ao cabo de um período pós-exposição adequado, são eutanasiados. Antes da eutanásia, os animais são tratados com um agente fixador da metáfase (por exemplo, colquicina ou Colcemid®). Seguidamente, são feitas preparações de cromossomas a partir das células germinais e, após serem coradas, as células em metáfase são analisadas para deteção de aberrações cromossómicas.

VERIFICAÇÃO DA COMPETÊNCIA DO LABORATÓRIO

10. A competência para este ensaio deve ser estabelecida mediante a demonstração da capacidade de reproduzir os resultados esperados em termos de frequências estruturais de aberrações cromossómicas em espermatogónias com substâncias de controlo positivo (incluindo respostas fracas), como as enumeradas no quadro 1, e a obtenção de frequências de controlo negativo coerentes com a gama aceitável de dados de controlo constantes da literatura publicada – p. ex.: (2) (3) (6) (7) (8) (9) (10) – ou com a distribuição do controlo histórico do laboratório, se disponível.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Preparações

Seleção de espécies animais

11. Devem ser utilizados animais adultos, jovens e saudáveis das espécies de laboratório mais comuns. São normalmente utilizados ratos machos; no entanto, os machos de outras espécies de mamíferos adequadas podem ser utilizados quando cientificamente justificado e para permitir que o ensaio seja realizado em conjunção com outro método de ensaio. A justificação científica para a utilização de outras espécies que não roedores deve constar do relatório.

Condições de alojamento e de alimentação dos animais

12. No caso dos roedores, a temperatura do biotério deve ser de 22 °C (±3 °C). Embora a humidade relativa ideal seja de 50-60 %, na prática pode descer a 40 %, não devendo exceder 70 %, exceto durante a lavagem do biotério. A iluminação deve ser artificial, com uma alternância de 12 horas de luz e 12 horas de obscuridade. Para a alimentação, podem ser usadas dietas convencionais de laboratório, com acesso ilimitado a água potável. Se o produto químico em estudo for administrado pela alimentação, a escolha da dieta poderá ser condicionada pela necessidade de assegurar a dosagem adequada. Os roedores devem ser alojados em pequenos grupos (não mais de cinco por gaiola), caso não se prevejam comportamentos agressivos, de preferência em gaiolas sólidas com um enriquecimento ambiental adequado. Os animais podem ser alojados individualmente se tal se justificar do ponto de vista científico.

▼M8

Preparação dos animais

13. Utilizam-se geralmente animais machos jovens adultos (8-12 semanas de idade no início do tratamento), distribuídos aleatoriamente pelos grupos de controlo e de tratamento. Os animais são identificados de forma unívoca, utilizando um método que não cause sofrimento e seja o menos invasivo possível (por exemplo: (p. ex., anilhagem, marcação, *microchip* ou identificação biométrica, mas não entalhe de orelhas nem amputação de falanges), e são aclimatados às condições de laboratório durante, pelo menos, cinco dias. As gaiolas devem estar dispostas de forma a minimizar possíveis efeitos derivados do seu posicionamento. Deve evitar-se a contaminação cruzada pelo controlo positivo e pelo produto químico em estudo. No início do estudo, a variação entre os pesos individuais dos animais deve ser mínima, não devendo exceder±20 %.

Preparação das doses

14. Os produtos químicos em estudo na forma sólida devem ser dissolvidos ou suspensos em solventes ou veículos adequados, ou misturados na dieta ou na água potável antes da administração aos animais. Os produtos químicos em estudo no estado líquido podem ser adicionados diretamente aos sistemas em estudo e/ou diluídos antes da administração. No caso das exposições por inalação, os produtos químicos em estudo podem ser administrados sob a forma de gás, vapor ou aerossol sólido/líquido, consoante as respetivas propriedades físico-químicas. Devem utilizar-se preparações frescas do produto químico em estudo, a menos que os dados de estabilidade demonstrem que o mesmo pode ser armazenado e determinem as condições de armazenagem adequadas.

Condições de ensaio — solvente/veículo

15. O solvente/veículo não deve produzir efeitos tóxicos nas doses utilizadas nem reagir quimicamente com o produto químico em estudo. A eventual utilização de solventes/veículos menos habituais deve ser fundamentada por dados de referência que indiquem a sua compatibilidade. Recomenda-se, sempre que possível, a utilização prioritária de solventes/veículos aquosos. A água, o soro fisiológico, uma solução de metilcelulose, uma solução de sal de sódio de carboximetilcelulose, o azeite e o óleo de milho constituem exemplos de solventes/veículos compatíveis de utilização comum. Na ausência de dados de controlo históricos ou publicados que demonstrem que o solvente/veículo atípico escolhido não induz nenhuma aberração estrutural cromossómica ou outros efeitos deletérios, deve realizar-se um ensaio preliminar destinado a estabelecer a aceitabilidade do controlo do solvente ou veículo.

Amostras de controlo positivo

16. Devem utilizar-se sempre animais de controlo positivo em paralelo, a menos que o laboratório tenha demonstrado competência na realização do ensaio e o tenha utilizado com regularidade no passado recente (nos últimos 5 anos, por exemplo). Se não for incluído um grupo de controlo positivo paralelo, cada experiência deve compreender controlos de contagem (lâminas fixas e não coradas). Estes podem ser realizados mediante a inclusão, no estudo, de amostras de referência adequadas obtidas e armazenadas a partir de um controlo positivo separado, efetuado a intervalos regulares (p. ex., a cada 6-18 meses), no laboratório em que o ensaio é realizado: por exemplo, em testes de competência e, subsequentemente, de uma forma regular, se necessário.

17. As substâncias de controlo positivo devem produzir, com fiabilidade, um aumento detetável na frequência de células com aberrações cromossómicas estruturais em relação ao nível de ocorrência espontânea. A dose de controlo positiva a administrar deve ser escolhida de modo a que os seus efeitos sejam claros, mas também a que as amostras codificadas não sejam imediatamente identificadas pelo operador que procede às leituras. O quadro 1 apresenta exemplos de substâncias de controlo positivas.

▼M8

Quadro 1

Exemplos de substâncias de controlo positivas

Substâncias [N.º CAS] (referência n.º)
Ciclofosfamida mono-hidratada [n.º CAS 50-18-0 (n.º CAS 6055-19-2)] (9)
Ciclo-hexilamina [n.º CAS 108-91-8] (7)
Mitomicina C [n.º CAS 50-07-7] (6)
Acrilamida monómera [n.º CAS 79-06-1] (10)
Trietilenomelamina [n.º CAS 51-18-3] (8)

Controlos negativos

18. Cada amostragem deve incluir animais de controlo negativo, tratados apenas com solvente ou veículo e, em todos os outros aspetos, da mesma forma que os grupos de tratamento. Na ausência de dados de controlo históricos ou publicados que demonstrem que o solvente/veículo escolhido não induz aberrações cromossómicas ou outros efeitos deletérios, todas as amostragens devem incluir igualmente animais de controlo sem tratamento, de modo a estabelecer a aceitabilidade do controlo do veículo.

PROCEDIMENTO

Número de animais

19. No início do estudo, as dimensões dos grupos devem ser estabelecidas de forma a assegurar um mínimo de 5 machos por grupo. Este número de animais por grupo é considerado suficiente para assegurar uma representatividade estatística adequada (isto é, permite, em geral, detetar pelo menos uma duplicação da frequência das aberrações cromossómicas com um nível de controlo negativo de 1,0 % ou superior, com uma probabilidade de 80 % a um nível de significância de 0,05) (3) (11). A título de orientação, um estudo realizado com dois tempos de amostragem, três grupos de doses e um grupo de controlo negativo em paralelo, além de um grupo de controlo positivo (cada um com cinco animais), requer 45 animais.

Programa de exposição

20. Os produtos químicos em estudo são geralmente administrados uma vez (ou seja, num único tratamento); podem ser utilizados outros regimes de dosagem, desde que cientificamente justificados.

21. No grupo exposto à dose mais elevada são realizadas duas amostragens após a exposição. Dado que o tempo necessário para a absorção e metabolização do(s) produto(s) químico(s) em estudo, bem como o efeito deste(s) na cinética do ciclo celular, pode afetar o momento ótimo para a deteção de uma eventual aberração cromossómica, recomenda-se a colheita de uma segunda amostra 24 horas após a primeira. Para as doses que não a dose mais elevada, deve prever-se uma amostragem precoce de 24 horas (inferior ou igual à duração do ciclo celular das espermatogónias B, de modo a otimizar a probabilidade de contagem das primeiras metáfases pós-tratamento) após o tratamento, a menos que se saiba que outro intervalo de amostragem é mais adequado e justificado.

22. Podem ser utilizados outros tempos de amostragem. Por exemplo, no caso de produtos químicos que induzam efeitos independentes do fator S, pode ser adequado efetuar amostragens mais precoces (ou seja, menos de 24 horas).

▼M8

23. O tratamento pode repetir as doses, nomeadamente em conjunção com um ensaio relativo a outros parâmetros que preveja um período de administração de 28 dias (por exemplo, método de ensaio B.58); no entanto, serão necessários outros grupos de animais para ter em conta os diferentes tempos de amostragem. A adequação de tal calendário tem de ser justificada cientificamente, numa base casuística.

24. Antes da eutanásia, os animais são injetados intraperitonealmente com uma dose apropriada de um produto químico de fixação da metáfase (por exemplo, colquicina ou Colcemid®). As amostras são colhidas a intervalos regulares a partir desse momento. No caso dos ratos e ratazanas, este intervalo é de, aproximadamente, 3 a 5 horas.

Níveis de dosagem

25. Se, por não existirem dados adequados disponíveis que possam servir de orientação na escolha das doses, for realizado um estudo exploratório da gama de dosagens a administrar, este deve ser realizado no mesmo laboratório, utilizando a mesma espécie, a mesma estirpe e o mesmo regime de exposição a utilizar no estudo principal, de acordo com recomendações para a realização de estudos exploratórios de determinação da gama de dosagens (12). O estudo deve ter por objetivo identificar a dose máxima tolerável (DMT), definida como a dose que, durante o período de ensaio, produz efeitos ligeiramente tóxicos (por exemplo, comportamentos ou reações anormais, ligeira redução do peso corporal ou citotoxicidade do sistema hematopoiético), mas não a morte ou sinais de dor, sofrimento ou tensão que obriguem à eutanásia dos animais (13).

26. A dose mais elevada pode igualmente ser definida como uma dose que produz algumas indicações de toxicidade nas espermatogónias (por exemplo, redução da taxa de mitose das espermatogónias na primeira e segunda metáfases meióticas; essa redução não deve ser superior a 50 %.

27. Os produtos químicos em estudo com atividade biológica específica em doses baixas não tóxicas (como hormonas e agentes mitogénicos) e os produtos químicos que apresentem saturação de propriedades toxicocinéticas podem ser exceções aos critérios de definição da dosagem e devem ser avaliados caso a caso.

28. Um estudo completo que vise obter informação sobre a resposta às doses deve incluir um grupo de controlo negativo (ponto 18) e, no mínimo, três níveis de dosagem, separados por um fator que, em geral, é 2 e não pode ser superior a 4. Se o produto químico em estudo não produzir efeitos tóxicos num estudo de avaliação da gama de dosagens ou com base em dados existentes, a dose mais elevada administrada de uma só vez deve ser de 2 000 mg/kg de peso corporal. Contudo, se o produto químico em estudo gerar toxicidade, a dose máxima administrada deve ser a DMT e as dosagens utilizadas devem, de preferência, abranger uma gama compreendida entre a dose máxima e uma dose de toxicidade baixa ou nula. Caso se observe toxicidade no tecido-alvo (testículos) em todas as dosagens ensaiadas, recomenda-se a realização de um estudo complementar com doses não tóxicas. Os estudos destinados a obter informações quantitativas dose-resposta mais precisas podem necessitar de mais grupos de dosagem. Os limites indicados podem variar no caso do estudo de certos tipos de produtos químicos (por exemplo medicamentos para uso humano) abrangidos por exigências específicas. Se o produto químico em estudo produzir toxicidade, deve selecionar-se a dose-limite e duas doses inferiores (conforme descrito *supra*). A dose-limite para um período de administração igual ou superior a 14 dias é de 1 000 mg/kg de peso corporal/dia e, para um período de administração inferior a 14 dias, a dose-limite é de 2 000 mg/kg de peso corporal/dia.

▼M8

Administração das doses

29. Na conceção de um ensaio, deve ter-se em mente a via prevista de exposição humana. Por conseguinte, desde que devidamente justificadas, podem escolher-se vias de exposição como a alimentação, a água de beber, as vias tópica, subcutânea ou intravenosa, a via oral (por gavagem), a via inalatória ou o recurso a implantes. A via escolhida deve garantir a exposição adequada do tecido-alvo. Em geral, a injeção intraperitoneal não é recomendada – a menos que se justifique cientificamente –, uma vez que não é uma via fisiologicamente relevante de exposição humana. Se o produto químico em estudo for misturado na alimentação ou na água de beber, especialmente no caso de dose única, deve prever-se um intervalo suficiente entre a ingestão dos alimentos ou da água e a amostragem, de modo a que os efeitos possam ser detetados (ver ponto 33). O volume máximo de líquido que pode ser administrado de uma só vez por gavagem ou injeção depende do tamanho do animal de ensaio, não devendo exceder 1 ml/100 g de peso corporal, exceto no que respeita a soluções aquosas, em que pode ser administrado um máximo de 2 ml/100 g de peso corporal. Deve justificar-se a utilização de volumes maiores (se permitida pela legislação no domínio do bem-estar dos animais). As variações no volume de ensaio devem ser minimizadas mediante o ajustamento da concentração, de modo a assegurar um volume constante em relação ao peso corporal em todas as dosagens.

Observações

30. Os animais de ensaio devem ser sujeitos a exames clínicos gerais, registando-se, pelo menos, uma vez por dia, de preferência à(s) mesma(s) hora(s), os sinais clínicos observados, tendo em conta o período de pico dos efeitos previstos após a exposição. Pelo menos duas vezes por dia, todos os animais devem ser observados para a deteção de sinais de morbilidade e mortalidade. Todos os animais devem ser pesados no início do estudo, bem como, pelo menos, uma vez por semana (em estudos com doses repetidas) e no momento da eutanásia. Nos estudos que se prolonguem por uma semana ou mais, o consumo de alimentos deve ser medido, pelo menos, uma vez por semana. Se o produto químico em estudo for administrado através da água de beber, o consumo desta deve ser medido em cada mudança de água e, pelo menos, uma vez por semana. Os animais que exibam indicadores não letais de toxicidade excessiva devem ser eutanasiados antes da conclusão do período de ensaio (13).

Preparação dos cromossomas

31. Imediatamente após a eutanásia, devem ser preparadas suspensões de células germinais, de um ou de ambos os testículos, que serão seguidamente expostas a uma solução hipotónica e fixadas, de acordo com protocolos estabelecidos – por exemplo, (2) (14) (15). As células são depois espalhadas em lâminas e coradas (16) (17). Todas as lâminas devem ser codificadas, para que o operador que procede às leituras não tenha acesso à sua identidade.

Análise

32. Devem ser contabilizadas pelo menos 200 metáfases com uma boa repartição para cada animal (3) (11). Se a frequência de controlo negativo histórico for < 1 %, devem ser contabilizadas mais de 200 células/animal para aumentar a representatividade estatística (3). Devem ser utilizados métodos de coloração que permitam identificar o centrómero.

33. As aberrações cromossómicas e cromatídicas devem ser registadas separadamente e classificadas em subtipos (quebras, intercâmbios). Importa registar as lacunas, que não devem ser tidas em conta, para determinar se um produto químico induz um aumento significativo da incidência de células com aberrações cromossómicas. Os procedimentos em laboratório devem garantir que a análise das aberrações cromossómicas é efetuada por operadores com formação adequada. Dado que os procedimentos de preparação de lâminas resultam frequentemente na rotura de uma determinada proporção de células

▼M8

em metáfase, com perda de cromossomas, as células contabilizadas devem, portanto, conter um número de centrómeros não inferior a 2 *n* ±2, em que *n* é o número de cromossomas haploides na espécie em causa.

34. Embora o objetivo do ensaio seja a deteção de aberrações cromossómicas estruturais, é importante registar as frequências de células poliploides e células com cromossomas endorreduplicados, caso ocorram (ver o ponto 44).

DADOS E RELATÓRIOS

Tratamento dos resultados

35. Os dados relativos a cada animal devem ser apresentados num quadro. Também para cada animal, devem verificar-se o número de células com aberrações cromossómicas estruturais e o número de aberrações cromossómicas por célula. As aberrações cromatídicas e cromossómicas, classificadas em subtipos (quebras, intercâmbios), devem ser enumeradas separadamente, com os respetivos números e frequências, para os grupos experimentais e os grupos de controlo. As lacunas são registadas separadamente. A frequência das lacunas é incluída no relatório, mas, em geral, não é tida em conta na análise da frequência total das aberrações cromossómicas estruturais. Devem registar-se as percentagens de poliploidia e de células com cromossomas endorreduplicadas, sempre que ocorram.

36. Devem comunicar-se os dados relativos à toxicidade e aos sinais clínicos, em conformidade com o ponto 30.

Critérios de aceitabilidade

37. A aceitabilidade de um ensaio é determinada pelos seguintes critérios:

— O controlo negativo em paralelo está em sintonia com as normas publicadas relativas a dados históricos de controlo negativo – segundo as quais a percentagem prevista de células com aberrações cromossómicas deverá ser, em geral, > 0 % e ≤ 1,5 % –, bem como com dados históricos de controlo do laboratório, se disponíveis (ver pontos 10 e 18).

— Os controlos positivos realizados em paralelo induzem respostas coerentes com as normas publicadas relativas a dados históricos de controlo positivo ou com base de dados históricos de controlo positivo do laboratório, se disponíveis, e produzem um aumento estatisticamente significativo em relação ao controlo negativo (ver pontos 17 e 18).

— Analisaram-se números adequados de células e doses (ver pontos 28 e 32).

— Os critérios de seleção da dose máxima são coerentes com os descritos nos pontos 25 e 26.

38. Se, para além das mitoses, também se observarem meioses, a relação entre o número de mitoses e de metáfases I ou II das espermatogónias deve ser determinada num total de 100 células em divisão por animal, para medição da citotoxicidade em todos os animais tratados e do controlo negativo. Se apenas se observarem mitoses, o índice mitótico deve ser calculado utilizando pelo menos 1 000 células de cada animal.

Avaliação e interpretação dos resultados

39. Devem analisar-se, pelo menos, três grupos tratados, de modo a proporcionar dados suficientes para uma análise da resposta à dosagem.

▼M8

40. Caso sejam cumpridos todos os critérios de aceitabilidade, o produto químico em estudo é considerado inequivocamente positivo se:

— pelo menos, uma das doses de ensaio apresentar um aumento estatisticamente significativo em relação ao controlo negativo;

— o aumento estiver relacionado com a dose em, pelo menos, um momento de amostragem;

— nenhum dos resultados estiver fora da gama aceitável de dados de controlo negativo ou da distribuição dos dados históricos de controlo negativo do laboratório (por exemplo, limites de controlo de 95 % com base numa distribuição de Poisson), caso existam.

Nesse caso, o produto químico em estudo é considerado passível de induzir aberrações cromossómicas em células espermatogónias dos animais de ensaio. As referências bibliográficas (11) e (18) contêm recomendações sobre os métodos estatísticos mais adequados. Os testes estatísticos utilizados devem considerar o animal a unidade experimental.

41. Caso sejam cumpridos todos os critérios de aceitabilidade, o produto químico em estudo é considerado inequivocamente negativo se:

— nenhuma das doses de ensaio apresentar um aumento estatisticamente significativo em relação ao controlo negativo;

— não se observar qualquer aumento relacionado com a dose em nenhuma condição experimental;

— todos os resultados estiverem dentro da gama aceitável de dados de controlo negativo ou dos dados históricos de controlo negativo do laboratório (por exemplo, limites de controlo de 95 % com base numa distribuição de Poisson), caso existam.

Nesse caso, o produto químico em estudo não é considerado passível de induzir aberrações cromossómicas nas células espermatogónias dos animais sujeitos ao ensaio. As referências bibliográficas (11) e (18) contêm recomendações sobre os métodos estatísticos mais adequados. Um resultado negativo não exclui a possibilidade de o produto químico induzir aberrações cromossómicas em fases de desenvolvimento posteriores não estudadas, ou mutações genéticas.

42. As respostas inequivocamente positivas ou inequivocamente negativas não carecem de confirmação.

43. Se a resposta não for inequivocamente negativa ou positiva, e a fim de contribuir para o estabelecimento da adequação biológica de um resultado (por exemplo, um aumento ténue ou no limite), os dados devem ser avaliados por pareceres de peritos e/ou estudos complementares que utilizem os dados experimentais existentes, nomeadamente para determinar se o resultado positivo está fora da gama aceitável de dados de controlo negativo ou dos dados históricos de controlo negativo do laboratório (19).

44. Em casos raros, mesmo após estudos complementares, os dados obtidos não permitem concluir se um resultado é positivo ou negativo, pelo que se considera inconclusivo.

45. Um aumento do número de células poliploides pode indicar que o produto químico em estudo apresenta potencial de inibição da mitose e de indução de aberrações cromossómicas numéricas (20). Um aumento do número de células com cromossomas endorreduplicados pode indicar que o produto químico em estudo apresenta potencial de inibição dos progressos do ciclo celular (21) (22), o que constitui um mecanismo de indução de mudanças cromossómicas numéricas diferente da inibição dos processos mitóticos (ver ponto 2). Por conseguinte, deve registar-se separadamente a incidência de células poliploides e de células com cromossomas endorreduplicados.

▼M8

Relatório de ensaio

46. O relatório de ensaio deve conter as seguintes informações:

Síntese.

Produto químico em estudo:

— origem, número de lote e data-limite de utilização, se conhecidos;

— estabilidade, se conhecida;

— solubilidade e estabilidade no solvente, se conhecidas;

— medição do pH, da pressão osmótica e da quantidade de precipitado no meio de cultura ao qual foi adicionado o produto químico em estudo, consoante o caso.

Substância monocomponente:

— aspeto físico, hidrossolubilidade e outras propriedades físico-químicas pertinentes;

— dados de identificação química, como: denominações IUPAC ou CAS, número CAS, código SMILES ou InChI, fórmula estrutural, pureza, identidade química de impurezas, caso se justifique e seja exequível, etc.

Substância multicomponentes, UVCB e misturas:

— caracterizada, na medida do possível, pela identidade química (ver acima), pela ocorrência quantitativa e pelas principais propriedades físico-químicas dos componentes.

Preparação do produto químico em estudo:

— justificação da escolha do veículo;

— solubilidade e estabilidade do produto químico em estudo no solvente/veículo.

— preparação de fórmulas alimentares, na água de beber ou inaláveis;

— determinações analíticas com essas fórmulas (p. ex., estabilidade, homogeneidade, concentrações nominais). quando realizadas.

Animais utilizados no ensaio:

— espécie/estirpe utilizada e justificação da utilização;

— número e idade dos animais,

— proveniência, condições de alojamento, alimentação, etc.;

— método de identificação unívoca dos animais

— para estudos de curta duração: peso individual dos animais machos no início e no final do teste; para estudos de duração superior a uma semana: pesos durante o estudo e consumo alimentar. Deve incluir-se, relativamente a cada grupo, a gama de pesos corporais, com a respetiva média e o desvio-padrão.

Condições de realização do ensaio:

— controlos positivos e negativos (veículo/solvente);

▼**M8**

— resultados do eventual estudo exploratório da gama de dosagem;

— fundamentação da escolha das doses;

— justificação da via de administração escolhida;

— detalhes da preparação do produto químico em estudo;

— elementos relativos à administração do produto químico em estudo;

— justificação do momento da eutanásia;

— métodos de medição da toxicidade para os animais, incluindo, sempre que disponíveis, análises histopatológicas ou hematológicas e a frequência com que foram realizadas observações dos animais e dos respetivos pesos corporais;

— métodos para verificar se o produto químico em estudo atingiu o tecido-alvo ou a circulação geral, caso se obtenham resultados negativos;

— dose real (mg/kg de peso corporal/dia), calculada a partir da concentração do produto químico em estudo nos alimentos ou na água de beber (ppm) e do consumo, se aplicável;

— elementos relativos à qualidade dos alimentos e da água;

— descrição detalhada da exposição e do programa de colheita de amostras e justificação das escolhas feitas;

— método de eutanásia;

— eventual método de analgesia;

— procedimentos para o isolamento de tecidos;

— identidade do agente de fixação da metáfase e respetiva concentração e duração do tratamento;

— métodos de preparação das lâminas;

— critérios de contabilização das aberrações;

— número de células analisadas por animal;

— critérios definidos para que o estudo seja considerado positivo, negativo ou inconclusivo.

Resultados:

— estado dos animais antes e durante o período de ensaio, incluindo sinais de toxicidade;

— peso corporal e dos órgãos no momento da eutanásia (se forem utilizados múltiplos tratamentos, peso corporal durante o período de tratamento);

— sinais de toxicidade;

— índice mitótico;

— proporção de células espermatogónias em mitose em relação às células em metáfase meiótica I ou II ou outras provas da exposição ao tecido-alvo;

— tipo e número de aberrações, discriminados por animal;

— número total de aberrações em cada grupo, com as respetivas médias e desvios-padrão;

▼**M8**

— número de células aberrantes em cada grupo, com as respetivas médias e desvios-padrão;

— relação dose-resposta, se possível;

— métodos estatísticos utilizados e análises estatísticas efetuadas;

— dados relativos ao controlo negativo realizado em paralelo com o ensaio;

— dados históricos de controlo negativo, com indicação de intervalos, médias, desvios-padrão e intervalos de confiança de 95 % (se disponíveis), ou dados históricos de controlo negativo publicados, utilizados para efeitos de aceitação dos resultados do ensaio;

— dados sobre o controlo positivo simultâneo;

— alterações da ploidia, quando observadas, incluindo as frequências de poliploidia e/ou de células endorreduplicadas;

Discussão dos resultados

Conclusão

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(1) OCDE (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No 234, OECD, Paris

(2) Adler, I.-D. (1984). Cytogenetic Tests in Mammals. In: Mutagenicity Testing: a Practical Approach. Ed. S. Venitt and J. M. Parry. IRL Press, Oxford, Washington DC, pp. 275-306.

(3) Adler I.-D., Shelby M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and Tanaka N. (1994). International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests. Mutation Res., 312, 313-318.

(4) Russo, A. (2000). *In Vivo* Cytogenetics: Mammalian Germ Cells. Mutation Res., 455, 167-189.

(5) Hess, R.A. and de Franca L.R. (2008). Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium. In: Molecular Mechanisms in Spermatogenesis, Cheng C.Y. (Ed.) Landes Bioscience and Springer Science+Business Media, pp. 1-15.

(6) Adler, I.-D. (1974). Comparative Cytogenetic Study after Treatment of Mouse Spermatogonia with Mitomycin C, Mutation. Res., 23(3): 368--379.Adler, I.D. (1986). Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications. In: Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis, Ramel C., Lambert B. and Magnusson J. (Eds.) Liss, New York, pp. 477-484.

(7) Cattanach, B.M., and Pollard C.E. (1971). Mutagenicity Tests with Cyclohexylamine in the Mouse, Mutation Res., 12, 472-474.

(8) Cattanach, B.M., and Williams, C.E. (1971). A search for Chromosome Aberrations Induced in Mouse Spermatogonia by Chemical Mutagens, Mutation Res., 13, 371-375.

(9) Rathenburg, R. (1975). Cytogenetic Effects of Cyclophosphamide on Mouse Spermatogonia, Humangenetik 29, 135-140.

▼**M8**

(10) Shiraishi, Y. (1978). Chromosome Aberrations Induced by Monomeric Acrylamide in Bone Marrow and Germ Cells of Mice, Mutation Res., 57(3): 313-324.

(11) Adler I-D., Bootman, J., Favor, J., Hook, G., Schriever-Schwemmer, G., Welzl, G., Whorton, E., Yoshimura, I. and Hayashi, M. (1998). Recommendations for Statistical Designs of *In Vivo* Mutagenicity Tests with Regard to Subsequent Statistical Analysis, Mutation Res., 417, 19–30.

(12) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. Mutagenesis, 7, 313-319.

(13) OCDE (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Series on Testing and Assessment, (No 19.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(14) Yamamoto, K. and Kikuchi, Y. (1978). A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes. Mutation Res., 52, 207-209.

(15) Hsu, T.C., Elder, F. and Pathak, S. (1979). Method for Improving the Yield of Spermatogonial and Meiotic Metaphases in Mammalian Testicular Preparations. Environ. Mutagen., 1, 291-294.

(16) Evans, E.P., Breckon, G., and Ford, C.E. (1964). An Air-Drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes. Cytogenetics and Cell Genetics, 3, 289-294.

(17) Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D.G. and Henderson, L. (1990). *In Vivo* Cytogenetics Assays, In: D.J. Kirkland (Ed.) Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.

(18) Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G.and Savage, J.R.K. (1989). Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays In: D.J. Kirkland (Ed.) Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184-232.

(19) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H.-J. and Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data. Mutation Res., 723, 87-90.

(20) Warr T.J., Parry E.M. and Parry J.M. (1993). A Comparison of Two *In Vitro* Mammalian Cell Cytogenetic Assays for the Detection of Mitotic Aneuploidy Using 10 Known or Suspected Aneugens, Mutation Res., 287, 29-46.

(21) Huang, Y., Change, C. and Trosko, J.E. (1983). Aphidicolin-Induced Endoreduplication in Chinese Hamster Cells. Cancer Res., 43, 1362--1364.

(22) Locke-Huhle, C. (1983). Endoreduplication in Chinese Hamster Cells during Alpha-Radiation Induced G2 Arrest. Mutation Res., 119, 403--413.

▼M8

Apêndice

DEFINIÇÕES

Aberração cromatídica: lesão estrutural de um cromossoma expressa na quebra, ou na quebra seguida de união, de cromatídeos simples.

Aberração cromossómica: lesão estrutural de um cromossoma expressa na quebra, ou na quebra seguida de união, de ambos os cromatídeos no mesmo local.

Aberração estrutural: alteração da estrutura dos cromossomas detetável por exame microscópico das células em metáfase, na forma de supressão de segmentos, de alterações de partes da sequência ou da troca de segmentos num cromatídeo ou entre cromatídeos.

Aberração numérica: alteração do número de cromossomas relativamente ao número de cromossomas característico dos animais utilizados.

Aneuploidia: desvio, num único ou em mais cromossomas, mas não por séries completas de cromossomas (poliploidia), do número diploide (ou haploide) normal de cromossomas.

Centrómero: região ou regiões de um cromossoma às quais se ligam as fibras fusiformes durante a divisão celular, permitindo o movimento organizado dos cromossomas-filhos para os polos das células-filhas.

Clastogénio: produto químico que provoca aberrações cromossomáticas estruturais em populações de células ou organismos.

Diversidade cromossómica: diversidade de formas (por exemplo, metacêntrica, acrocêntrica, etc.) e tamanhos dos cromossomas.

Genotóxico: termo genérico que abrange todos os tipos de danos no ADN ou nos cromossomas, incluindo fraturas, supressão de segmentos, aduções, ligações e alterações nucleotídicas, rearranjos, mutações, aberrações cromossómicas e aneuploidia. Nem todos os tipos de efeitos genotóxicos originam mutações ou danos cromossómicos estáveis.

Índice mitótico (MI): relação entre o número de células em metáfase e o número total de células observadas numa população de células, que fornece uma indicação do grau de proliferação da população em causa.

Lacuna: lesão acromática de extensão inferior à largura de um cromatídeo e que determina um ligeiro desalinhamento do mesmo.

Mitose: divisão do núcleo celular, habitualmente subdividida em prófase, prometáfase, metáfase, anáfase e telófase.

Mutagénico: que produz uma alteração hereditária de sequências de pares de bases do ADN em genes ou da estrutura dos cromossomas (aberrações cromossómicas).

Poliploidia: número de cromossomas múltiplo do número haploide (n), mas diferente do número diploide (ou seja, $3n$, $4n$ e assim por diante).

Produto químico: uma substância ou mistura.

Produto químico em estudo: qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado o presente método de ensaio.

UVCB: substâncias químicas de composição desconhecida ou variável, produtos de reação complexos e materiais biológicos.

▼M7

_____

▼B

B.25. **TRANSLOCAÇÃO HEREDITÁRIA NO RATINHO**

1. **MÉTODO**

1.1. INTRODUÇÃO

Ver Introdução Geral, parte B.

1.2. DEFINIÇÃO

Ver Introdução Geral, parte B.

1.3. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

Nenhuma.

1.4. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

O teste de translocação hereditária no ratinho detecta alterações cromossómicas estruturais e numéricas nas células germinais de mamífero que são postas em evidência na descendência da primeira geração. Os tipos de alterações cromossómicas detectadas são as translocações recíprocas e, se for incluída a descendência do sexo feminino, a perda do cromossoma X. Os portadores de translocações e as fêmeas XO apresentam uma fertilidade reduzida, permitindo a selecção de uma descendência F_1 para análise citogenética. Alguns tipos de translocação provocam esterilidade total (X--autossoma e tipo c-t). As translocações são observadas por métodos citogenéticos nas células meióticas na diacinese-metafase I de indivíduos do sexo masculino, sejam machos F_1 ou filhos de fêmeas F_1. As fêmeas XO são identificadas citogeneticamente pela presença de apenas 39 cromossomas nas mitoses da medula óssea.

1.5. CRITÉRIOS QUALITATIVOS

Nenhum.

1.6. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

Preparativos

As substâncias a testar são dissolvidas numa solução salina isotónica. Se forem insolúveis na água serão dissolvidas ou colocadas em suspensão em veículos apropriados. Utilizam-se soluções preparadas de fresco da substância a testar. Se se utilizar um veículo para facilitar a administração este não deve interferir com a substância a testar nem produzir efeitos tóxicos.

Via de administração

As vias de administração são habitualmente a intubação oral ou a injecção intraperitoneal. Podem ser adequadas outras vias de administração.

Animais de experiência

Estas experiências são efectuadas em ratinhos para facilitar a reprodução e a verificação citológica. Não é requerida nenhuma estirpe específica. No entanto, o número médio de crias por ninhada da estirpe utilizada deverá ser superior a oito e ser relativamente constante.

Serão utilizados animais sãos tendo já atingido a maturidade sexual.

▼B

Número de animais

O número de animais necessários depende da frequência de translocações espontâneas bem como da taxa de indução mínima requerida para um resultado positivo.

O teste consiste habitualmente na análise da descendência masculina F_1. Serão testados pelo menos 500 descendentes masculinos F_1 por cada dose. Se se incluir a descendência feminina F_1, serão necessários 300 machos e 300 fêmeas.

Controlos negativos e positivos

Devem estar disponíveis dados de controlo adequados provenientes de provas realizadas simultaneamente ou de experiências anteriores. Quando existirem dados aceitáveis de controlos positivos provenientes de experiências efectuadas recentemente no mesmo laboratório, estes podem ser utilizados em vez de controlos positivos simultâneos.

Doses

É testada apenas uma dose, tratando-se habitualmente da dose máxima associada à produção de efeitos tóxicos mínimos mas não afectando o comportamento reprodutor nem a sobrevivência. Para estabelecer uma relação dose/resposta são necessárias duas doses adicionais, mais baixas. No caso de substâncias não tóxicas, deverá recorrer-se a uma exposição à dose máxima praticável.

Procedimento

Tratamento e acasalamento

São possíveis dois esquemas de tratamento. A administração única da substância a testar é o método mais frequente. A substância a testar pode também ser administrada sete dias por semana durante 35 dias. O número de acasalamentos depois do tratamento é determinado pelo esquema de tratamento e será tal que todos os estádios de células germinais sejam implicados. No fim do período de acasalamento as fêmeas são colocadas em gaiolas individuais. Quando as fêmeas parirem registar-se-ão a data, o número de crias da ninhada e o sexo das crias. Toda a descendência do sexo masculino é desmamada e toda a do sexo feminino afastada a não ser que esteja incluída na experiência.

Pesquisa dos heterozigóticos de translocação

É utilizado um de dois métodos disponíveis:

— análise da fertilidade da descendência F_1 e verificação ulterior de eventuais portadores de translocações por análise citogenética,

— análise citogenética de todos os machos F_1 sem selecção prévia por verificação da fertilidade.

a) Análise da fertilidade

A diminuição de fertilidade de um indivíduo F_1 pode ser determinada observando-se o número de crias da ninhada e/ou analisando o conteúdo uterino das fêmeas com que acasalou.

Deverão estabelecer-se critérios para determinação da fertilidade normal e diminuída da estirpe de ratinhos utilizada.

▼B

Observação do número de animais por ninhada: Os machos F_1 a testar são colocados em gaiolas individuais com fêmeas provenientes da mesma experiência ou da colónia. As gaiolas são inspeccionadas diariamente a partir do dia 18 após o acasalamento. O número de crias da ninhada e o sexo da descendência F_2 são registados na ocasião do nascimento, sendo as crias eliminadas em seguida. Se se testar a descendência do sexo feminino F_1 então os descendentes F_2 provenientes de ninhadas pequenas são conservados com vista a uma análise mais profunda. As fêmeas portadoras de uma translocação serão objecto de uma verificação por análise citogenética de uma translocação em qualquer dos seus descendentes machos. As fêmeas XO são identificadas pela alteração da razão macho/ /fêmea na sua descendência que passa de 1/1 para 1/2 machos/ /fêmeas. Num método sequencial os animais F_1 normais não serão objecto de outra verificação se a primeira ninhada F_2 atingir ou ultrapassar um valor normal preestabelecido, senão observar-se-á uma segunda ou uma terceira ninhada F_2.

Os animais F_1 que não puderem ser classificados como normais após uma observação de até três ninhadas F_2 no máximo, serão submetidos seja a um novo controlo por análise do conteúdo uterino das fêmeas com que acasalaram, seja directamente a uma análise citogenética.

Análise do conteúdo uterino: A redução do número de crias por ninhada nos portadores de translocação é devida à morte de embriões, de modo que um grande número de implantes mortos indica a presença de uma translocação no animal submetido ao teste. Cada macho F_1 a testar é acasalado com duas ou três fêmeas. A concepção é confirmada pela inspecção matinal diária das fêmeas para detectar a presença de rolhão vaginal. As fêmeas são sacrificadas 14 a 16 dias mais tarde, registando-se o número de implantes vivos e mortos presentes nos seus úteros.

b) Análise citogenética

As preparações de testículo são efectuadas pelo método de secagem ao ar. Os portadoras de translocações são identificados pela presença de configurações multivalentes na diacinese-metafase I nos espermatócitos primários. A observação de pelo menos duas células apresentando uma associação multivalente constitui a prova necessária de que o animal testado é portador de uma translocação.

Se não tiver sido efectuada nenhuma selecção por análise de fertilidade, todos os machos F_1 são submetidos a um exame citogenético. Devem ser analisadas ao microscópio um mínimo de 25 células em diacinese-metafase I por macho. É necessário o exame das metafases mitóticas nas espermatogónias ou na medula óssea, no caso dos machos tendo testículos pequenos ou apresentando uma paragem meiótica antes da diacinese ou no caso das fêmeas F_1 suspeitas de serem XO. A presença de um cromossoma anormalmente longo e/ou curto em alguma de 10 células é a prova de uma translocação particular acarretando a esterilidade do macho (tipo c-t). Algumas translocações X-autossoma provocando a esterilidade do macho podem apenas ser identificadas por uma análise de bandas de cromossomas mitóticos. A presença de 39 cromossomas em 10 mitoses por cada 10 é a prova de um estado XO numa fêmea.

2. **RESULTADOS**

Os resultados são apresentados sob a forma de quadros.

O número médio de crias por ninhada e a razão entre os sexos são registados à nascença e no desmame para cada período de acasalamento.

▼B

Quando da avaliação da fertilidade dos animais F_1 deverão apresentar-se o número médio de crias por ninhada das ninhadas resultantes de todos os acasalamentos normais bem como o número de crias individual das ninhadas provenientes de animais F_1 portadores de translocação. No que respeita à análise do conteúdo uterino serão anotados o número médio de implantes vivos e mortos resultantes de acasalamentos normais e o número de implantes vivos e mortos para cada acasalamento de animais portadores de translocação.

Quando da análise citogenética da diacinese-metafase I, serão registados os diferentes tipos de configurações multivalentes e o número total de células para cada portador de translocação.

Para os indivíduos F_1 estéreis serão indicados o número total de acasalamentos e a duração do período de acasalamento. Serão indicados o peso dos testículos bem como os pormenores da análise citogenética.

Para as fêmeas XO indicar-se-á o número de crias médio por ninhada, a razão entre os sexos na descendência F_2, bem como os resultados da análise citogenética.

Se forem seleccionados eventuais portadores de translocação F_1 por testes de fertilidade os quadros deverão mencionar quantos deles foram confirmados como sendo heterozigóticos de translocação.

Serão apresentados os dados relativos aos controlos negativos bem como as experiências de controlo positivo.

3. **RELATÓRIO**

3.1. RELATÓRIO DO TESTE

O relatório do teste deverá incluir as seguintes informações:

— estirpe de ratinho utilizada, idade dos animais, peso dos animais tratados,

— número de animais progenitores de cada sexo nos grupos tratados e de controlo,

— condições experimentais, descrição pormenorizada do tratamento, doses, solventes, esquema de acasalamento,

— número e sexo de crias por fêmea, número e sexo das crias mantidas para uma análise de translocação,

— momento e critérios da análise de translocação,

— número e descrição pormenorizada dos portadores de translocação, incluindo dados relativos à reprodução e ao conteúdo uterino, se possível,

— métodos citogenéticos e pormenores da análise microscópica, de preferência com fotografias,

— avaliação estatística,

— discussão dos resultados,

— interpretação dos resultados.

▼B

3.2. AVALIAÇÃO E INTERPRETAÇÃO

Ver Introdução Geral, parte B.

4. **REFERÊNCIAS**

Ver Introdução Geral, parte B.

▼B

B.26. ENSAIO DE TOXICIDADE ORAL SUBCRÓNICA ESTUDO DE TOXICIDADE ORAL DE DOSE REPETIDA EM ROEDORES COM A DURAÇÃO DE 90 DIAS

1. MÉTODO

O presente método de ensaio da toxicidade oral subcrónica é idêntico ao método OCDE TG 408 (1998).

1.1. INTRODUÇÃO

Ao avaliarem-se as características tóxicas de uma substância química poderá proceder-se à determinação da toxicidade oral subcrónica utilizando doses repetidas depois de se ter obtido informação inicial sobre a toxicidade a partir de ensaios de toxicidade aguda ou de dose repetida com a duração de 28 dias. O estudo de 90 dias permite obter informação sobre os perigos para a saúde susceptíveis de decorrer de uma exposição repetida ao longo de um período de tempo prolongado, abrangendo a maturação e o crescimento após o desmame e prolongando-se pela vida adulta. O estudo permitirá obter informação sobre os principais efeitos tóxicos, identificar os órgãos-alvo e a possibilidade de acumulação, bem como fazer uma estimativa de um nível de exposição sem efeitos adversos observados a utilizar na selecção dos níveis de administração em estudos crónicos e na determinação de critérios de segurança para a exposição no caso de seres humanos.

O método utilizado dá um maior destaque aos terminais neurológicos e permite formar uma ideia sobre os efeitos imunológicos e ao nível da reprodução. Deve salientar-se a necessidade de efectuar uma observação clínica pormenorizada dos animais, de modo a obter-se o máximo de informação possível. Este estudo deve permitir também identificar substâncias susceptíveis de causar efeitos neurotóxicos, imunológicos ou ao nível dos órgãos de reprodução, que poderão justificar uma investigação mais aprofundada.

Ver também a parte B da Introdução Geral.

1.2. DEFINIÇÕES

Dose: quantidade de substância administrada. A dose é expressa em termos de massa (g, mg) ou em termos da massa da substância em estudo por massa unitária do animal estudado (por exemplo, mg/ /kg), ou em termos de concentrações dietéticas constantes (ppm).

Dosagem: termo geral que abrange a dose administrada, bem como a frequência e duração da administração.

NOAEL: abreviatura de «*no observed adverse effect level*» («dose sem efeitos adversos observados»), que consiste na dose máxima ou no nível de exposição máximo que não produz efeitos adversos detectáveis no ensaio atribuíveis ao mesmo.

1.3. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

A substância em estudo é administrada diariamente por via oral, em doses crescentes (uma dose por lote), a vários lotes de animais de ensaio, durante um período de 90 dias. No decurso deste período, os animais são examinados em pormenor, com vista à detecção de quaisquer sinais de toxicidade. Efectua-se a autópsia dos animais que morrem ou são sacrificados durante o ensaio e, no final do mesmo, procede-se ao abate dos sobreviventes e à respectiva autópsia.

▼B

1.4. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.4.1. **Preparação dos animais**

Devem ser utilizados animais saudáveis que tenham sido aclimatados às condições laboratoriais durante pelo menos cinco dias e não tenham sido anteriormente submetidos a procedimentos experimentais. Os animais utilizados no estudo devem ser caracterizados quanto à espécie, estirpe, proveniência, sexo, peso e/ou idade. Os animais devem ser repartidos aleatoriamente pelos grupos de ensaio e de controlo. As gaiolas devem ser dispostas de modo a reduzir ao mínimo os eventuais efeitos devidos à respectiva colocação. Deve ser atribuído a cada animal um número de identificação diferente.

1.4.2. **Preparação das doses**

A substância em estudo é administrada por intermédio de uma sonda gástrica ou através da alimentação ou da água de beber. O método de administração oral depende do objectivo do ensaio, bem como das propriedades físico-químicas da substância em estudo.

Se necessário, a substância é dissolvida ou suspensa num veículo adequado. Sempre que possível, recomenda-se que se considere primeiramente a possibilidade de se utilizar uma solução ou suspensão aquosa; em segundo lugar, uma solução ou emulsão em óleo (nomeadamente óleo de milho); e, por último, uma solução noutro veículo. No caso de se utilizar um veículo não aquoso, devem conhecer-se as respectivas características de toxicidade. Deve também determinar-se a estabilidade da substância nas condições de administração.

1.4.3. **Condições de ensaio**

1.4.3.1. *Animais a utilizar no ensaio*

Embora possa recorrer-se a outros roedores, como por exemplo o ratinho, o rato constitui a espécie preferida. Devem utilizar-se animais adultos, jovens e saudáveis, de estirpes correntes de laboratório. As fêmeas devem ser nulíparas e não grávidas. A administração da substância deve ter início logo que possível após o desmame e, em qualquer caso, antes de os animais completarem nove semanas de idade. No início do estudo, a variação de massa dos animais deve ser mínima, não excedendo ± 20 % da massa média de cada sexo. Caso o estudo preceda um estudo da toxicidade crónica a longo prazo, é conveniente utilizar em ambos os casos animais da mesma estirpe e proveniência.

1.4.3.2. *Número e sexo*

Para cada dose devem utilizar-se, pelo menos, 20 animais (10 machos e 10 fêmeas). Caso se preveja o sacrifício de alguns animais durante o ensaio, o referido número deve ser acrescido do número de animais a sacrificar. Com base em conhecimentos anteriores da substância em estudo ou de um análogo próximo, deverá considerar-se a possibilidade de incluir um lote extra de 10 animais (cinco de cada sexo) no grupo de controlo e no grupo a que irá ser administrada a dose máxima, a fim de se observar, após o período de ensaio, a reversibilidade ou persistência de eventuais efeitos tóxicos. A duração deste período de observação deverá ser correctamente estabelecida tendo em conta os efeitos a observar.

▼B

1.4.3.3. *Doses*

Devem ser utilizadas pelo menos três doses e um controlo simultâneo, excepto nos casos em que seja realizado um ensaio-limite (ver 1.4.3.4). As doses poderão basear-se nos resultados de estudos de dose repetida ou de determinação da gama, e deverão levar em conta todos os dados toxicológicos e toxicocinéticos existentes para a substância em estudo ou substâncias afins. A dose máxima deve ser seleccionada com a finalidade de provocar toxicidade, mas não a morte nem um sofrimento excessivo, a não ser que a natureza físico-química ou os efeitos biológicos da substância em estudo determinem que a referida dose seja limitada. Deve seleccionar-se uma sequência decrescente de doses, com o objectivo de evidenciar uma correlação entre a dose administrada e a reacção observada, bem como a ausência de efeitos adversos associados à administração da dose mínima (NOAEL). A diferença óptima entre as doses consiste, frequentemente, num factor de 2 a 4; em muitos casos, a utilização de um quarto lote de ensaio é preferível ao recurso a intervalos de grande amplitude (por exemplo, superior a um factor de 6-10) entre as doses.

O grupo de controlo deve ser constituído por animais aos quais não é administrada a substância em estudo ou um grupo de controlo do veículo se for utilizado um veículo para administrar a substância em estudo. Com excepção da exposição à substância em estudo, os animais do grupo de controlo devem ser manuseados de forma idêntica aos outros animais. Caso se recorra a um veículo para a administração da substância em estudo, deve administrar-se o volume máximo do mesmo aos animais do lote de controlo. Se a substância em estudo for administrada através dos alimentos e causar um menor consumo alimentar, será vantajoso utilizar-se um grupo de controlo alimentado aos pares para se distinguir entre as reduções que se devem à palatabilidade e a alterações toxicológicos no modelo em estudo.

Deverão considerar-se as seguintes características do veículo e outros aditivos, conforme aplicável; efeitos ao nível da absorção, distribuição, metabolismo ou retenção da substância em estudo; efeitos nas propriedades químicas da substância em estudo susceptíveis de alterar as suas características tóxicas; e efeitos no consumo de alimentos ou água ou no estado nutricional dos animais.

1.4.3.4. *Ensaio-limite*

Sempre que um ensaio, realizado de acordo com o presente método, que utilize uma dose de pelo menos 1 000 mg/kg de massa corporal/dia, não produza efeitos tóxicos observáveis, ou se, tendo em conta dados referentes a substâncias estruturalmente afins, não se prevejam efeitos tóxicos, poderá não ser necessário efectuar um ensaio completo com três doses. Nestes casos, justifica-se a realização de um ensaio-limite, excepto se a exposição humana indicar a necessidade de recurso a uma dose superior.

1.5. PROCEDIMENTO

1.5.1. **Administração das doses**

A substância é administrada diariamente aos animais durante um período de 90 dias; em casos devidamente justificados, pode proceder-se à administração cinco dias por semana. A administração forçada deve efectuar-se numa dose única, por intermédio de uma sonda gástrica ou de uma cânula de intubação adequada. O volume máximo de líquido que pode administrar-se de cada vez depende das dimensões do animal. Esse volume não deve exceder 1 ml/100 g de massa corporal, excepto no caso de soluções aquosas, em que se poderá utilizar um volume de 2 ml/100 g de massa corporal. Salvo no caso de substâncias corrosivas ou irritantes, cujos efeitos são, de modo geral, agravados em concentrações mais elevadas, devem minimizar-se as variações no volume mediante o ajustamento da concentração, de modo a assegurar um volume constante para todas as doses.

▼B

Caso a substância em estudo seja administrada através dos alimentos ou da água de beber, deve assegurar-se que as respectivas quantidades não perturbam o equilíbrio nutricional e hídrico normal. Se a substância for administrada com os alimentos, pode utilizar-se uma concentração alimentar constante, expressa em ppm, ou uma dose constante, expressa em relação à massa corporal dos animais; deve especificar-se a alternativa adoptada. No caso do recurso a uma sonda gástrica, a dose deve ser administrada diariamente à mesma hora e, se necessário, ajustada de modo a manter uma dose constante em relação à massa corporal do animal. Caso um ensaio de 90 dias preceda um estudo da toxicidade crónica a longo prazo, é conveniente utilizar uma dieta semelhante em ambos os ensaios.

1.5.2. **Observações**

O período de observação deve ser de, pelo menos, 90 dias. Os animais incluídos nos lotes extra destinados a observações subsequentes devem ser mantidos durante um período de tempo suficiente sem administração da substância em estudo de modo a detectar a persistência ou a recuperação dos efeitos tóxicos.

Deve efectuar-se um exame clínico pelo menos uma vez por dia, de preferência à mesma hora, em função do período previsto de efeitos mais agudos devidos à administração da substância, registando-se o estado de saúde dos animais. Todos os animais deverão ser examinados pelo menos duas vezes por dia, normalmente ao princípio e ao fim de cada dia, a fim de se identificarem sinais de morbilidade e mortalidade.

Deve proceder-se a um exame clínico aprofundado de todos os animais pelo menos uma vez antes da primeira exposição (de modo a permitir efectuar comparações para o mesmo indivíduo) e uma vez por semana após a mesma. O exame deve decorrer no exterior da gaiola, num recinto adequado e, de preferência, à mesma hora. As observações devem ser cuidadosamente registadas, de preferência por recurso a um sistema definido em pormenor pelo laboratório em causa. Deve procurar-se assegurar que as variações nas condições de observação sejam mínimas. Os sinais anotados devem incluir, nomeadamente, alterações na pele, no pêlo, nos olhos e nas mucosas, bem como a ocorrência de secreções, excreções ou actividade autónoma (como, por exemplo, lacrimação, erecção pilosa, alterações nas pupilas, respiração anormal). Devem também registar-se quaisquer alterações da atitude, postura e reacção à manipulação, além da ocorrência de movimentos clónicos ou tónicos e comportamentos estereotipados (por exemplo, actos de higiene repetitivos, movimentos circulares repetitivos) ou estranhos (automutilação, marcha para a retaguarda) (1).

Deve proceder-se a um exame oftalmológico, utilizando um oftalmoscópio ou equipamento equivalente adequado, antes de se iniciar a administração da substância em estudo e ao terminar o estudo, de preferência a todos os animais, ou pelo menos aos animais dos grupos de dose máxima e de controlo. Se forem detectadas alterações nos olhos, devem examinar-se todos os animais.

Na fase final do período de exposição, mas, em qualquer caso, nunca antes da 11.ª semana, deve proceder-se à avaliação da reactividade sensorial a estímulos de diferentes tipos (1) (por exemplo, estímulos auditivos, visuais e proprioceptivos) (2), (3), (4), avaliação da força de preensão (5) e avaliação da actividade motora (6). Para mais pormenores sobre os procedimentos que se podem utilizar, devem consultar-se as respectivas referências. No entanto, também se poderão adoptar procedimentos alternativos aos indicados nas referências.

As observações funcionais poderão ser omitidas na fase final do estudo quando existirem dados sobre observações funcionais de outros estudos e os exames clínicos realizados diariamente não revelarem quaisquer deficiências funcionais.

▼B

Excepcionalmente, podem omitir-se as observações funcionais no caso de lotes que apresentem sinais de toxicidade cuja intensidade seja susceptível de interferir de modo significativo com as mesmas.

1.5.2.1. *Massa corporal e consumo de alimentos/água*

Todos os animais devem ser pesados pelo menos uma vez por semana. O consumo de alimentos deve ser medido pelo menos uma vez por semana. Se a substância em estudo for administrada através da água de beber, deve também medir-se o consumo de água pelo menos uma vez por semana. O consumo de água também poderá ser levado em conta em estudos dietéticos ou de administração forçada em que esse consumo se possa alterar.

1.5.2.2. *Hematologia e bioquímica clínica*

Devem colher-se amostras de sangue de um local designado e, caso aplicável, essas amostras deverão ser armazenadas em condições adequadas. No final do período de estudo, serão colhidas amostras logo antes de se abaterem os animais ou como parte do procedimento de abate.

No final do ensaio e no caso de terem sido colhidas amostras de sangue intercalares, devem determinar-se os seguintes parâmetros hematológicos: hematócrito, concentração de hemoglobina, contagem de eritrócitos, contagem total e diferencial de leucócitos, contagem de plaquetas e medida do tempo/potencial de coagulação.

Devem também efectuar-se determinações bioquímicas destinadas a investigar os principais efeitos tóxicos sobre os tecidos, nomeadamente renal e hepático, com amostras de sangue de todos os animais, colhidas imediatamente antes do respectivo abate ou no âmbito do mesmo (com excepção dos animais encontrados moribundos ou abatidos no decurso do ensaio). Tal como no caso de estudos hematológicos, poderá efectuar-se uma recolha de amostras intercalares para efeito de análises bioquímicas clínicas. Recomenda-se que os animais sejam jejuados desde a véspera da colheita de sangue ([1]). Os parâmetros a determinar no plasma ou no soro são os seguintes: sódio, potássio, glicose, colesterol total, ureia, creatinina, proteínas totais e albumina, além de, pelo menos, dois enzimas indicadores dos efeitos hepatocelulares (tais como a alanina-aminotransferase, a aspartato-aminotransferase, a fosfatase alcalina, a gama-glutamil transpeptidase e a sorbitol-desidrogenase). A determinação de outras enzimas de origem hepática ou diversa, bem como de ácidos biliares, poderá, em determinados casos, proporcionar informações úteis.

Em opção, podem realizar-se na última semana do ensaio as seguintes determinações na urina, recolhida de acordo com um programa previamente estabelecido: aparência, volume, osmolalidade ou gravidade específica, pH, proteínas, glicose e sangue/hematócitos.

Além disso, deve prever-se a pesquisa de marcadores séricos que forneçam indicações gerais sobre a lesão de tecidos. Caso as propriedades conhecidas da substância afectem, ou se preveja que possam afectar, perfis metabólicos conexos, devem realizar-se outras determinações, nomeadamente de cálcio, fosfatos, triglicéridos em jejum, hormonas específicas, meta-hemoglobina e colinesterase. A necessidade de efectuar tais determinações é estabelecida em função do tipo de substância em estudo ou de cada caso específico.

([1]) Para a determinação de determinados parâmetros no soro e no plasma, nomeadamente a glicose, é preferível que os animais sejam jejuados desde a véspera, principalmente porque, não sendo jejuados, haverá inevitavelmente uma maior variabilidade que tenderá a encobrir os efeitos mais subtis e a tornar difícil a interpretação dos resultados. No entanto, por outro lado, o jejum desde a véspera poderá interferir no metabolismo geral dos animais, e, particularmente em estudos alimentares, poderá perturbar a exposição diária à substância em estudo. Se for adoptado o jejum desde a véspera, deverão efectuar-se determinações bioquímicas após a realização das observações funcionais do estudo.

▼B

De um modo geral, deve adoptar-se uma abordagem flexível, em função das espécies e dos efeitos observados e/ou previstos da substância em causa.

Se os dados disponíveis relativos a ensaios anteriores se revelarem inadequados, haverá que decidir sobre a necessidade de se determinarem parâmetros hematológicos e bioquímicos antes de administrar a substância. De um modo geral, não se recomenda que estes dados sejam gerados antes de se iniciar a administração (7).

1.5.2.3. *Autópsia geral*

Todos os animais devem ser objecto de uma autópsia geral pormenorizada que inclua o exame da superfície exterior do corpo, dos orifícios e das cavidades craniana, torácica e abdominal, bem como do respectivo conteúdo. Devem remover-se de modo adequado as membranas aderentes a órgãos tais como o fígado, os rins, as glândulas supra-renais, os testículos, os epidídimos, o timo, o baço, o cérebro e o coração, cuja massa húmida deve ser determinada logo que possível após a dissecação, de modo a evitar a respectiva dessecação. Este procedimento aplica-se a todos os animais (excepto os que estiverem moribundos ou tiverem sido abatidos no decurso do ensaio).

Os órgãos e tecidos que se seguem devem ser conservados num meio de fixação adequado aos mesmos, bem como ao tipo de exame histopatológico subsequente: todos os tecidos que apresentem lesões evidentes, encéfalo (regiões representativas, nomeadamente cérebro, cerebelo e protuberância), espinal medula (a três níveis: cervical, médio-torácico e lombar), pituitária, tiróide, paratiróide, timo, esófago, glândulas salivares, estômago, intestino delgado e cólon (incluindo as placas de Peyer), fígado, rins, glândulas supra-renais, baço, coração, traqueia e pulmões (conservados por insuflação com fixador seguida de imersão), aorta, gónadas, útero, órgãos genitais acessórios, glândula mamária (nas fêmeas), próstata, bexiga, vesícula (ratinho), gânglios linfáticos (de preferência um gânglio situado na via de administração e um gânglio distante da mesma, de modo a investigar possíveis efeitos sistémicos), nervos periféricos (ciático ou tibial), de preferência na proximidade de músculos, e uma secção de medula óssea (ou, como alternativa, um aspirado de medula óssea recentemente montado), pele e olhos (se tiverem sido observadas alterações no exame oftalmológico). Em função das observações clínicas ou de natureza diversa efectuadas, poderá ser necessário examinar outros tecidos. Devem também conservar-se quaisquer órgãos susceptíveis de constituírem alvos da substância em estudo, em virtude das propriedades conhecidas da mesma.

1.5.2.4. *Histopatologia*

Deve proceder-se ao exame histopatológico dos órgãos e tecidos conservados dos animais dos grupos de controlo, bem como dos lotes sujeitos a doses elevadas. Caso o exame destes últimos revele alterações atribuíveis à substância em estudo, devem examinar-se também os animais de todos os lotes restantes.

Devem examinar-se todas as lesões importantes.

Sempre que se recorra a um lote extra, deve proceder-se ao exame histopatológico dos tecidos e órgãos que tenham revelado alterações nos animais dos restantes lotes.

▼B

2. **RESULTADOS E SUA APRESENTAÇÃO**

2.1. DADOS

Devem registar-se os dados relativos a cada animal. Além disso, todos os dados devem ser resumidos num quadro, referindo-se, para cada lote de ensaio, o número de animais no início do ensaio, o número de animais encontrados mortos durante o ensaio ou abatidos por uma questão de humanidade, a hora da morte de cada animal, o número de animais que apresentam sinais de toxicidade, a descrição dos sinais de toxicidade observados, nomeadamente o tempo decorrido até à respectiva manifestação, bem como a sua duração e gravidade, o número de animais que apresentem lesões, o tipo de lesões e a percentagem de animais que apresentam cada tipo de lesões.

Caso aplicável, os resultados numéricos devem ser avaliados segundo um método estatístico adequado e geralmente aceite. Os métodos estatísticos e dados a serem analisados devem ser seleccionados durante a fase de concepção do estudo.

2.2. RELATÓRIO DO ENSAIO

O relatório do ensaio deverá incluir as seguintes informações:

2.2.1. **Substância em estudo:**

— natureza física, pureza e propriedades físico-químicas,

— dados de identificação,

— veículo (caso aplicável): justificação da escolha de um veículo não aquoso.

2.2.2. **Espécie submetida ao ensaio:**

— espécie e estirpe utilizada,

— número, idade e sexo dos animais,

— origem, condições de acomodação, alimentação, etc.,

— massa de cada animal no início do ensaio.

2.2.3. **Condições do ensaio:**

— justificação das doses seleccionadas,

— pormenores relativos à preparação da substância em estudo e à sua eventual incorporação nos alimentos, nomeadamente a respectiva concentração, estabilidade e homogeneidade,

— modo de administração da substância em estudo,

— doses reais (mg/kg massa corporal/dia), e factor de conversão da concentração da substância em estudo na alimentação/abeberação (ppm) para a dose real, quando aplicável,

— pormenores relativos à qualidade dos alimentos e da água.

2.2.4. **Resultados:**

— massa corporal e respectivas alterações,

— consumo de alimentos e de água, se for caso disso,

— reacções tóxicas em função do sexo e da dose administrada, nomeadamente sinais de toxicidade,

▼B

— natureza, gravidade e duração dos sinais clínicos (reversíveis ou não),

— resultados do exame oftalmológico,

— dados relativos à actividade sensorial, força de preensão e actividade motora (caso existam),

— resultados da análise hematológica, acompanhados dos respectivos parâmetros de base,

— resultados da análise bioquímica, acompanhados dos respectivos parâmetros de base,

— massa corporal final, massa dos órgãos e relações massas dos órgãos/massa corporal,

— dados obtidos por autópsia,

— descrição pormenorizada dos resultados do exame histopatológico,

— dados de absorção, caso se encontrem disponíveis,

— tratamento estatístico dos resultados, se for caso disso.

Discussão dos resultados.

Conclusões.

3. **REFERÊNCIAS**

(1) IPCS, (1986) Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No 60.

(2) Tupper, D.E., Wallace, R.B., (1980) Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp., 40, p. 999-1003.

(3) Gad, S.C., (1982) A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J.Toxicol. Environ. Health, 9, p. 691-704.

(4) Moser, V.C., Mc Daniel, K.M., Phillips, P.M., (1991) Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol., 108, p. 267-283.

(5) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C., Riley M.T., (1979) A Method for the Routine Assesment of Fore- and Hind-limb grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxivol., 1, p. 233--236.

(6) Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C., (1991) Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13, p. 599--609.

(7) Weingand K., Brown G., Hall R. *et al.* (1996). Harmonisation of Animal Clinic Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies, Fundam. & Appl. Toxicol, 29, pp. 198-201.

▼B

B.27. ENSAIO DE TOXICIDADE ORAL SUBCRÓNICA ESTUDO DE TOXICIDADE ORAL DE DOSE REPETIDA EM ESPÉCIES NÃO ROEDORAS COM A DURAÇÃO DE 90 DIAS

1. MÉTODO

O presente método de ensaio da toxicidade oral subcrónica é idêntico ao método OCDE TG 409 (1998).

1.1. INTRODUÇÃO

Ao avaliarem-se as características tóxicas de uma substância, poderá proceder-se à determinação da toxicidade oral subcrónica utilizando doses repetidas depois de se ter obtido informação inicial sobre a toxicidade em ensaios de toxicidade aguda ou de dose repetida com a duração de 28 dias. O estudo de 90 dias permite obter informação sobre os perigos para a saúde susceptíveis de decorrer de uma exposição repetida ao longo de um período de crescimento rápido e até ao início da vida adulta. O estudo permitirá obter informação sobre os principais efeitos tóxicos, identificar os órgãos-alvo e a possibilidade de acumulação, bem como fazer uma estimativa de um nível de exposição sem efeitos adversos observados a utilizar na selecção dos níveis de administração em estudos crónicos e na determinação de critérios de segurança para a exposição no caso de seres humanos.

O método de ensaio permite identificar, em espécies não roedoras, os efeitos adversos da exposição a substâncias químicas e deve ser utilizado apenas:

— nos casos em que os efeitos observados noutros estudos revelem a necessidade de clarificação/caracterização numa segunda espécie não roedora, ou

— nos casos em que estudos toxicocinéticos revelem que uma determinada espécie não roedora é a escolha de animal laboratorial mais adequada, ou

— nos casos em que outras razões específicas justifiquem a utilização de uma espécie não roedora.

Ver também a parte B da Introdução Geral.

1.2. DEFINIÇÕES

Dose: quantidade de substância administrada. A dose é expressa em termos de massa (g, mg) ou em termos da massa da substância de ensaio por massa unitária do animal estudado (por exemplo, mg/ /kg), ou em termos de concentrações dietéticas constantes (ppm).

Dosagem: termo geral que abrange a dose administrada, bem como a frequência e duração da administração.

NOAEL: abreviatura de «no *observed adverse effect level*» («dose sem efeitos adversos observados»), que consiste na dose máxima ou no nível de exposição máximo que não produz efeitos adversos detectáveis no ensaio atribuíveis ao mesmo.

1.3. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

A substância em estudo é administrada diariamente por via oral, em doses crescentes (uma dose por lote), a vários lotes de animais de ensaio, durante um período de 90 dias. No decurso deste período os animais são examinados em pormenor, com vista à detecção de quaisquer sinais de toxicidade. Efectua-se a autópsia dos animais que morrem ou são sacrificados durante o ensaio e, no final do mesmo, procede-se ao abate dos sobreviventes e à respectiva autópsia.

▼B

1.4. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.4.1. **Selecção das espécies animais**

A espécie não roedora normalmente utilizada é o cão, que deve ser de uma raça específica: utiliza-se frequentemente o *beagle*. Poderão também utilizar-se outras espécies, como, por exemplo, suínos ou mini-suínos. Não se recomendam primatas, cuja utilização deve ser justificada. Devem utilizar-se animais jovens e saudáveis, e, no caso do cão, a administração deve iniciar-se de preferência aos 4-6 meses, o mais tardar aos 9 meses de idade. No caso de o estudo preceder um estudo da toxicidade crónica a longo prazo, deve utilizar-se a mesma espécie/raça em ambos os casos.

1.4.2. **Preparação dos animais**

Devem ser utilizados animais saudáveis que tenham sido aclimatados às condições laboratoriais e não tenham sido anteriormente submetidos a processos experimentais. A duração da aclimatação dependerá da espécie seleccionada para o ensaio e da sua proveniência. Recomenda-se uma aclimatação de pelo menos cinco dias para os cães ou suínos especificamente criados para o efeito a partir de uma colónia residente, e pelo menos duas semanas para suínos de proveniência externa. Os animais utilizados no estudo devem ser caracterizados quanto à espécie, estirpe, proveniência, sexo, peso e/ou idade. Os animais devem ser repartidos aleatoriamente pelos grupos de ensaio e de controlo. As gaiolas devem ser dispostas de modo a que eventuais efeitos devidos à respectiva colocação sejam minimizados. Deve atribuir-se a cada animal um número de identificação diferente.

1.4.3. **Preparação das doses**

A substância em estudo pode ser administrada através dos alimentos ou da água de beber, por sonda gástrica ou em cápsulas. O método de administração oral depende do objectivo do ensaio, bem como das propriedades físico-químicas da substância em estudo.

Se necessário, a substância é dissolvida ou suspensa num veículo adequado. Sempre que possível, recomenda-se que se considere primeiramente a possibilidade de se utilizar uma solução ou suspensão aquosa; em segundo lugar, uma solução ou emulsão em óleo (nomeadamente óleo de milho); e, por último, uma solução noutro veículo. No caso de se utilizar um veículo não aquoso, devem conhecer-se as respectivas características de toxicidade. Deve também determinar-se a estabilidade da substância nas condições de administração.

1.5. PROCEDIMENTOS

1.5.1. **Número e sexo dos animais**

Para cada dose devem utilizar-se, pelo menos, oito animais (quatro machos e quatro fêmeas). Caso se preveja o sacrifício de alguns animais durante o ensaio, o referido número deve ser acrescido do número de animais a sacrificar. O número de animais no final do estudo deve ser suficiente para permitir uma avaliação válida dos efeitos tóxicos. Com base em conhecimentos anteriores da substância em estudo ou de um análogo próximo, deverá considerar-se a possibilidade de incluir um lote extra de oito animais (quatro por sexo) no grupo de controlo e no grupo a que irá ser administrada a dose máxima, a fim de se observar, após o período de ensaio, a reversibilidade ou persistência de eventuais efeitos tóxicos. A duração deste período de observação deverá ser correctamente estabelecida tendo em conta os efeitos a observar.

▼B

1.5.2. **Dosagem**

Devem ser utilizadas pelo menos três doses e um controlo simultâneo, excepto nos casos em que seja realizado um ensaio-limite (ver 1.5.3). As doses poderão basear-se nos resultados de estudos de dose repetida ou de determinação da gama e deverão levar em conta todos os dados toxicológicos e toxicocinéticos existentes relativos ao composto em estudo ou a substâncias afins. A dose máxima deve ser seleccionada com a finalidade de provocar toxicidade, mas não a morte nem um sofrimento excessivo, a não ser que a natureza físico-química ou os efeitos biológicos da substância em estudo determinem que a referida dose seja limitada. Deve seleccionar-se uma sequência decrescente de doses, com o objectivo de evidenciar uma correlação entre a dose administrada e a reacção observada, bem como a ausência de efeitos adversos associados à administração da dose mínima (NOAEL). A diferença óptima entre as doses consiste, frequentemente, num factor de 2 a 4; em muitos casos, a utilização de um quarto lote de ensaio é preferível ao recurso a intervalos de grande amplitude (por exemplo, superior a um factor de 6-10) entre as doses.

O grupo de controlo deve ser constituído por animais aos quais não é administrada a substância em estudo ou um grupo de controlo do veículo se for utilizado um veículo para administrar a substância em estudo. Com excepção da exposição à substância em estudo, os animais do grupo de controlo devem ser manuseados de forma idêntica aos outros animais. Caso se recorra a um veículo para a administração da substância em estudo, deve administrar-se o volume máximo do mesmo aos animais do lote de controlo. Se a substância em estudo for administrada através dos alimentos provocando um menor consumo alimentar, será vantajoso utilizar-se um grupo de controlo alimentado aos pares para se distinguir entre as reduções que se devem à palatabilidade e a alterações toxicológicos no modelo em estudo.

Deverão considerar-se as seguintes características do veículo e outros aditivos, conforme aplicável: efeitos ao nível da absorção, distribuição, metabolismo ou retenção da substância em estudo; efeitos nas propriedades químicas da substância em estudo susceptíveis de alterar as suas características tóxicas; e efeitos no consumo de alimentos ou água ou no estado nutricional dos animais.

1.5.3. **Ensaio-limite**

Sempre que um ensaio, realizado de acordo com o presente método, que utilize uma dose de, pelo menos, 1 000 mg/kg de massa corporal/dia, não produza efeitos tóxicos observáveis, ou se, tendo em conta dados referentes a substâncias estruturalmente afins, não se prevejam efeitos tóxicos, poderá não ser necessário efectuar um ensaio completo com três doses. Nestes casos justifica-se a realização de um ensaio-limite, excepto se a exposição humana indicar a necessidade de recurso a uma dose superior.

1.5.4. **Administração das doses**

A substância é administrada diariamente aos animais durante um período de 90 dias; em casos devidamente justificados, pode proceder-se à administração cinco dias por semana. A administração forçada deve efectuar-se numa dose única, por intermédio de uma sonda gástrica ou de uma cânula de intubação adequada. O volume máximo de líquido que pode administrar-se de cada vez depende das dimensões do animal. Normalmente, deve administrar-se o mínimo volume possível. Salvo no caso de substâncias corrosivas ou irritantes, cujos efeitos são, de modo geral, agravados em concentrações mais elevadas, devem minimizar-se as variações no volume mediante o ajustamento da concentração, de modo a assegurar um volume constante para todas as doses.

▼B

Caso a substância em estudo seja administrada através dos alimentos ou da água de beber, deve assegurar-se que as respectivas quantidades não perturbam o equilíbrio nutricional e hídrico normal. Se a substância for administrada com os alimentos, pode utilizar-se uma concentração alimentar constante, expressa em ppm, ou uma dose constante, expressa em relação à massa corporal dos animais; deve especificar-se a alternativa adoptada. No caso de uma substância administrada por meio de uma sonda gástrica ou cápsula, a dose deve ser administrada diariamente à mesma hora e, se necessário, ajustada de modo a manter uma dose constante em relação à massa corporal do animal. Caso um ensaio de 90 dias preceda um estudo da toxicidade crónica a longo prazo, é conveniente utilizar uma dieta semelhante em ambos os ensaios.

1.5.5. **Observações**

O período de observação deve ser de, pelo menos, 90 dias. Os animais incluídos nos lotes extra destinados a observações subsequentes devem ser mantidos em observação durante um período de tempo suficiente sem administração da substância em estudo, de modo a detectar a persistência ou a recuperação dos efeitos tóxicos.

Deve efectuar-se um exame clínico pelo menos uma vez por dia, de preferência à mesma hora, em função do período previsto de efeitos mais agudos devidos à administração da substância, registando-se o estado de saúde dos animais. Todos os animais deverão ser examinados pelo menos duas vezes por dia, normalmente ao princípio e ao fim de cada dia, a fim de se identificarem sinais de morbilidade e mortalidade.

Deve proceder-se a um exame clínico aprofundado de todos os animais pelo menos uma vez antes da primeira exposição (de modo a permitir efectuar comparações com o mesmo indivíduo) e uma vez por semana após a mesma. Estas observações devem ser feitas, caso possível, fora da gaiola, num recinto adequado, e de preferência sempre às mesmas horas. Deve procurar-se assegurar que as variações nas condições de observação sejam mínimas. Os sinais de toxicidade devem ser cuidadosamente registados, incluindo a hora a que se manifestaram, a sua intensidade e duração. As observações devem incluir alterações na pele, no pêlo, nos olhos e nas mucosas, bem como a ocorrência de secreções, excreções ou actividade autónoma (como, por exemplo, lacrimação, erecção pilosa, alterações nas pupilas, respiração anormal). Devem também registar-se quaisquer alterações da atitude, postura e reacção à manipulação, além da ocorrência de movimentos clónicos ou tónicos e comportamentos estereotipados (por exemplo, actos de higiene repetitivos, movimentos circulares repetitivos) ou estranhos.

Deve proceder-se a um exame oftalmológico, utilizando um oftalmoscópio ou equipamento equivalente adequado, antes de se iniciar a administração da substância em estudo e ao terminar o estudo, de preferência a todos os animais, mas pelo menos, aos animais dos grupos de dose máxima e de controlo. Se forem detectadas alterações nos olhos atribuíveis à substância em estudo, devem examinar-se todos os animais.

1.5.5.1. *Massa corporal e consumo de alimentos/água*

Todos os animais devem ser pesados pelo menos uma vez por semana. O consumo de alimentos deve ser medido pelo menos uma vez por semana. Se a substância em estudo for administrada através da água de beber, deve também medir-se o consumo de água pelo menos uma vez por semana. O consumo de água também poderá ser levado em conta em estudos dietéticos ou de administração forçada em que esse consumo se possa alterar.

▼B

1.5.5.2. *Hematologia e bioquímica clínica*

Devem colher-se amostras de sangue de um local designado e, caso aplicável, essas amostras deverão ser armazenadas em condições adequadas. No final do período de estudo serão colhidas amostras mesmo antes de se abaterem os animais ou como parte do procedimento de abate.

No início do estudo e, posteriormente, a intervalos mensais ou a meio do período do estudo, e, por último, no final do estudo, devem determinar-se os seguintes parâmetros hematológicos: hematócrito, concentração de hemoglobina, contagem de eritrócitos, contagem total e diferencial de leucócitos, contagem de plaquetas e medida do potencial de coagulação, como, por exemplo, tempo de coagulação, tempo de protrombina, ou tempo do tromboplastina.

Devem também efectuar-se determinações bioquímicas destinadas a investigar os principais efeitos tóxicos sobre os tecidos, nomeadamente renal e hepático, com amostras de sangue de todos os animais, colhidas no início do estudo, em seguida mensalmente ou a meio do período do estudo, e, por último, no final do período do estudo. As áreas de ensaio que devem ser consideradas são o equilíbrio electrolítico, o metabolismo dos hidratos de carbono, e as funções hepática e renal. A selecção de ensaios específicos será feita com base em observações do modo de acção da substância em estudo. Recomenda-se que os animais sejam jejuados durante um período de tempo adequado para a respectiva espécie antes de se proceder à colheita de amostras de sangue. Sugere-se que sejam determinados os seguintes parâmetros: cálcio, fósforo, cloreto, sódio, potássio, glicose em jejum, alanina-aminotransferase, aspartato-aminotransferase, ornitina descarboxilase, gama-glutamil--transpeptidase, nitrogénio ureico, albumina, creatinina no sangue, bilirrubina total e proteína sérica total.

Devem efectuar-se determinações na urina pelo menos no início, seguidamente a meio, e, por último, no final do estudo de acordo com um programa previamente estabelecido. As determinações a efectuar na urina devem incluir a aparência, volume, osmolalidade ou gravidade específica, pH, proteínas, glicose e sangue/hematócitos. Caso necessário, poderão utilizar-se outros parâmetros a fim de alargar o estudo de um ou mais efeitos observados.

Além disso, deve prever-se a pesquisa de marcadores séricos que forneçam indicações gerais sobre a lesão de tecidos. Entre outras determinações que poderão ser necessárias para uma avaliação toxicológica adequada referem-se análises de lípidos, hormonas, equilíbrio ácidos/bases, meta-hemoglobina e inibição da colinesterase. Caso necessário, poderão efectuar-se outras determinações bioquímicas para alargar o estudo dos efeitos observados. A necessidade de efectuar tais determinações é estabelecida em função do tipo de substância em estudo ou de cada caso específico.

De um modo geral, deve adoptar-se uma abordagem flexível, em função das espécies e dos efeitos observados e/ou previstos da substância em causa.

1.5.5.3. *Autópsia geral*

Todos os animais devem ser objecto de uma autópsia geral pormenorizada que inclua o exame da superfície exterior do corpo, dos orifícios e das cavidades craniana, torácica e abdominal, bem como do respectivo conteúdo. Devem remover-se de modo adequado as membranas aderentes a órgãos tais como o fígado (com a vesícula), os rins, as glândulas supra-renais, os testículos, os epidídimos, os ovários, o útero, a tiróide (com paratiróides), o timo, o baço, o cérebro e o coração, cuja massa húmida deve ser determinada logo que possível após a dissecação, de modo a evitar a respectiva dessecação. Este procedimento aplica-se a todos os animais (excepto os que estiverem moribundos ou tiverem sido abatidos no decurso do ensaio).

▼B

Os órgãos e tecidos que se seguem devem ser conservados num meio de fixação adequado aos mesmos, bem como ao tipo de exame histopatológico subsequente: todos os tecidos que apresentem lesões evidentes, encéfalo (regiões representativas, nomeadamente cérebro, cerebelo e protuberância), espinal medula (a três níveis: cervical, médio-torácico e lombar), pituitária, olhos, tiróide, paratiróide, timo, esófago, glândulas salivares, estômago, intestino delgado e cólon (incluindo as placas de Peyer), fígado, vesícula, pâncreas, rins, glândulas supra-renais, baço, coração, timo, tiróide, traqueia e pulmões, aorta, gónadas, útero, órgãos genitais acessórios, glândula mamária feminina, bexiga, gânglios linfáticos (de preferência um gânglio situado na via de administração e um gânglio distante da mesma, de modo a investigar possíveis efeitos sistémicos), nervos periféricos (ciático ou tibial), de preferência na proximidade de músculos, e uma secção de medula óssea (ou, como alternativa, um aspirado de medula óssea recentemente montado) e pele. Em função das observações clínicas ou de natureza diversa efectuadas, poderá ser necessário examinar outros tecidos. Devem também conservar-se quaisquer órgãos susceptíveis de constituírem alvos da substância em estudo, em virtude das propriedades conhecidas da mesma.

1.5.5.4. *Histopatologia*

Deve proceder-se ao exame histopatológico dos órgãos e tecidos conservados dos animais dos grupos de controlo, bem como dos lotes sujeitos a doses elevadas. Caso o exame destes últimos revele alterações atribuíveis à substância em estudo, devem examinar-se também os animais de todos os lotes restantes.

Devem examinar-se todas as lesões importantes.

Sempre que se recorra a um lote extra, deve proceder-se ao exame histopatológico dos tecidos e órgãos que tenham revelado alterações nos animais dos restantes lotes.

2. RESULTADOS E SUA APRESENTAÇÃO

2.1. DADOS

Devem registar-se os dados relativos a cada animal. Além disso, todos os dados devem ser resumidos num quadro, referindo-se, para cada lote de ensaio, o número de animais no início do ensaio, o número de animais encontrados mortos durante o ensaio ou abatidos por uma questão de humanidade, a hora da morte de cada animal, o número de animais que apresentam sinais de toxicidade, a descrição dos sinais de toxicidade observados, nomeadamente o tempo decorrido até à respectiva manifestação, bem como a sua duração e gravidade, o número de animais que apresentem lesões, o tipo de lesões e a percentagem de animais que apresentam cada tipo de lesões.

Caso aplicável, os resultados numéricos devem ser avaliados segundo um método estatístico adequado e geralmente aceite. Os métodos estatísticos e dados a serem analisados devem ser seleccionados durante a fase de concepção do estudo.

2.2. RELATÓRIO DO ENSAIO

O relatório do ensaio deverá incluir as seguintes informações:

▼B

2.2.1. **Substância em estudo:**

— natureza física, pureza e propriedades físico-químicas,

— dados de identificação

— veículo (caso aplicável): justificação da escolha de um veículo não aquoso.

2.2.2. **Espécie submetida ao ensaio:**

— espécie e a estirpe utilizada,

— número, idade e sexo dos animais,

— origem, condições de acomodação, alimentação, etc.,

— massa de cada animal no início do ensaio.

2.2.3. **Condições do ensaio:**

— justificação para a selecção das doses,

— pormenores relativos à preparação da substância em estudo e à sua eventual incorporação nos alimentos, nomeadamente a respectiva concentração, estabilidade e homogeneidade,

— modo de administração da substância em estudo,

— doses reais (mg/kg massa corporal/dia) e factor de conversão da concentração da substância em estudo na alimentação/abeberação (ppm) para a dose real, quando aplicável,

— pormenores relativos à qualidade dos alimentos e da água.

2.2.4. **Resultados:**

— massa corporal e respectivas alterações,

— consumo de alimentos e de água, se for caso disso,

— reacções tóxicas em função do sexo e da dose administrada, nomeadamente sinais de toxicidade,

— natureza, gravidade e duração dos sinais clínicos (reversíveis ou não),

— exame oftalmológico,

— resultados da análise hematológica, acompanhados dos respectivos parâmetros de base,

— resultados da análise bioquímica, acompanhados dos respectivos parâmetros de base,

— massa corporal final, massa dos órgãos e relações massas dos órgãos/massa corporal,

— dados obtidos por autópsia,

— descrição pormenorizada dos resultados do exame histopatológico,

— dados de absorção, caso se encontrem disponíveis,

— eventual tratamento estatístico dos resultados.

Discussão dos resultados.

Conclusões.

▼B

B.28. **TOXICIDADE DÉRMICA SUBCRÓNICA: TESTE DE DOSE REPETIDA POR VIA DÉRMICA, A NOVENTA DIAS, EM ROEDORES**

1. **MÉTODO**

1.1. INTRODUÇÃO

Ver Introdução Geral, parte B.

1.2. DEFINIÇÕES

Ver Introdução Geral, parte B.

1.3. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

Nenhuma.

1.4. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

A substância a testar é aplicada diariamente em doses graduais na pele dos animais dos vários grupos, à razão de uma dose por grupo por um período de noventa dias. Durante o período de aplicação, os animais são observados diariamente para se detectarem manifestações de toxicidade. Os animais que morrem durante a experiência são autopsiados e no fim da experiência os animais sobreviventes são igualmente autopsiados.

1.5. CRITÉRIOS QUALITATIVOS

Nenhum.

1.6. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

Preparativos

Os animais são mantidos nas condições de alojamento e de alimentação da experiência, durante pelo menos cinco dias antes do teste. Antes de começar o teste os animais jovens e sãos são distribuídos ao acaso pelos grupos submetidos ao tratamento e de controlo. Pouco tempo antes de se iniciar o ensaio rapam-se os pêlos da região dorsal dos animais. Se se recorrer à tosquia esta deverá ser efectuada mais ou menos 24 horas antes do teste. Normalmente é necessário repetir estas operações todas as semanas devendo tomar-se muito cuidado para não lesar a pele. A área destinada à aplicação da substância a testar não poderá ser inferior a 10 % da superfície corporal. O peso do animal entrará em linha de conta na decisão da zona a expor e da dimensão da superfície a tratar. Sempre que se testam substâncias sólidas, que podem ser pulverizadas se necessário, a substância a testar deve ser humedecida com água ou com um veículo apropriado para garantir um bom contacto com a pele. As substâncias a testar líquidas são geralmente usadas sem ser diluídas. Procede-se a uma aplicação diária durante cinco a sete dias por semana.

Condições experimentais

Animais de experiência

Podem ser utilizados o rato, o coelho ou a cobaia; também podem usar-se outras espécies, sendo necessário justificar o seu emprego. No início da experiência a diferença de peso entre os animais não poderá ultrapassar ± 20 % do peso médio. Se um estudo dérmico subcrónico constituir a fase preliminar de um estudo a longo prazo, deve utilizar-se a mesma espécie e estirpe em ambos os estudos.

▼B

Número e sexo

Para cada dose serão utilizados pelo menos 20 animais (10 fêmeas e 10 machos) de pele sã. As fêmeas deverão ser nulíparas e não grávidas. Se for previsível sacrificar alguns animais durante a experiência devem acrescentar-se ao número inicial o número de animais que se prevê sacrificar. Para além destes poderá haver um grupo-satélite de 20 animais (10 de cada sexo) tratado com a dose mais elevada, durante 90 dias e observado quanto à reversibilidade, à persistência ou aparecimento tardio de efeitos tóxicos durante 28 dias após o tratamento.

Doses

São necessárias pelo menos três doses diferentes com um controlo ou um veículo de controlo se for usado um veículo. O período de exposição deverá no mínimo ser de seis horas por dia. A substância a testar será aplicada diariamente à mesma hora e a quantidade a administrar será ajustada regularmente (semanalmente ou bissemanalmente), de modo a manter-se constante relativamente ao peso corporal do animal. Os animais do grupo de controlo serão tratados da mesma maneira que os animais dos grupos de experiência com excepção da aplicação da substância a testar. Se se utilizar um veículo para facilitar a administração, este será administrado ao grupo de controlo da mesma forma que aos grupos tratados, devendo a dose corresponder à do grupo tratado com a dose mais elevada. A dose mais elevada será determinada de forma a produzir efeitos tóxicos mas nunca, ou raramente, a morte do animal; a dose mais baixa não deverá produzir quaisquer efeitos tóxicos. Se se dispuser de informação sobre a exposição humana, a dose mais baixa deverá exceder esse valor. O ideal seria a dose intermédia produzir o efeito tóxico mínimo observável. Se se utilizarem várias doses intermédias a diferença entre elas será calculada de forma a conseguir-se uma gradação dos efeitos tóxicos. Nos grupos das doses mais baixa e intermédia a incidência de mortalidade deverá ser baixa para permitir uma avaliação significativa dos resultados.

Se a aplicação da substância a testar provocar uma grave irritação cutânea, deverão reduzir-se as concentrações, o que poderá originar uma diminuição ou até um desaparecimento dos outros efeitos tóxicos da dose mais elevada. Se as lesões cutâneas forem muito graves, pode tornar-se necessário interromper a experiência e recomeçá-la com concentrações mais fracas.

Teste-limite

Se já tiver sido efectuada uma experiência preliminar com uma dose de 1 000 mg/kg ou com uma dose mais elevada em função da possibilidade de uma exposição humana conhecida, que não tenha provocado quaisquer efeitos tóxicos, será inútil prosseguir a experiência.

Período de observação

Os animais da experiência serão observados diariamente para detectar manifestações de toxicidade. Serão registados o momento da morte e o momento do aparecimento e desaparecimento das manifestações de toxicidade.

▼B

Procedimento

Os animais serão colocados em gaiolas individuais. Em condições ideais a substância a testar será administrada aos animais sete dias por semana durante um período de 90 dias.

Os animais de todos os grupos-satélite que forem objecto de observações complementares serão mantidos vivos durante mais 28 dias, sem tratamento, para se detectar a recuperação ou a persistência dos efeitos tóxicos. O tempo de exposição será de seis horas por dia.

A substância a testar será aplicada uniformemente numa área equivalente a 10 % da superfície total do corpo. No caso de substâncias altamente tóxicas, a superfície a utilizar poderá ser menor mas a camada da substância deverá ser o mais fina e uniforme possível.

Durante a exposição a substância a testar é mantida em contacto com a pele por meio de uma gaze porosa e de um adesivo antialérgico. A superfície tratada será por sua vez convenientemente coberta de maneira a manter no seu lugar a gaze e a substância a testar, e a evitar que os animais ingiram a dita substância. Podem utilizar-se aparelhos de contenção, para evitar a ingestão da substância, mas não se recomenda a imobilização completa.

No fim do tempo de exposição, se possível, é necessário eliminar todos os resíduos da substância com água ou por meio de qualquer outro método adequado de limpeza da pele.

Os animais serão observados diariamente, sendo sempre registadas as manifestações de toxicidade assim como o momento do seu aparecimento, a sua intensidade e duração. Durante o período de cativeiro observar-se-ão as modificações do pêlo e da pele, dos olhos e das mucosas, do aparelho respiratório, aparelho circulatório, do sistema nervoso autónomo e central, assim como da actividade somatomotora e do comportamento. O consumo alimentar e o peso dos animais serão determinados semanalmente. Devem observar-se regularmente os animais a fim de se evitarem perdas por canibalismo, por autólise dos tecidos ou por condições impróprias de alojamento. No fim da experiência todos os animais sobreviventes dos grupos tratados não satélites serão autopsiados. Os animais moribundos serão imediatamente retirados e autopsiados.

Os exames que a seguir se enunciam são normalmente feitos a todos os animais incluindo os controlos:

a) Um exame oftalmológico usando um oftalmoscópio ou equipamento adequado equivalente deve ser feito antes da administração da substância a testar e no fim da experiência, de preferência a todos os animais, ou pelo menos nos grupos da dose mais elevada e de controlo. Se se detectarem alterações oculares devem examinar-se todos os animais;

b) Um exame hematológico será efectuado no fim da experiência compreendendo os seguintes testes: hematócrito, concentração de hemoglobina, contagem de eritrócitos, contagem de leucócitos, fórmula leucocitária, bem como um estudo da coagulação e tempo de coagulação, tempo de protrombina, tempo de tromboplastina, ou contagem de plaquetas;

▼B

c) A determinação de dados bioquímicos no sangue deve ser feita no fim da experiência. Apresentam um interesse geral para todos os estudos a avaliação do equilíbrio electrolítico, do metabolismo dos hidratos de carbono, da função hepática e renal. A escolha dos testes específicos será influenciada por observações relativas ao modo de acção da substância a testar. Sugere-se o doseamento do cálcio, fósforo, cloretos, sódio, potássio, glicose em jejum (o período de jejum dependerá da espécie), transaminase glutâmico-pirúvica sérica ([1]), transaminase glutâmico-oxaloacética sériea ([2]), ornitina-descarboxilase, gama-glutamil transpeptidase, azoto ureico, albumina, creatinina plasmática, bilirubina total e as proteínas séricas totais. As outras análises eventualmente necessárias a uma avaliação toxicológica adequada incluem análises de lípidos, hormonas, equilíbrio ácido-básico, methemoglobina, e actividade colinesterásica. Podem efectuar-se outras análises bioquímicas clínicas, se necessário, para aprofundar o estudo dos efeitos observados;

d) Um exame regular da urina não é necessário; este exame só é indicado em caso de efeitos tóxicos prováveis ou manifestos.

Se a informação de estudos anteriores não for apropriada deverá considerar-se a necessidade de determinação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos clínicos antes de começar a experiência.

Autópsia

Todos os animais serão submetidos a uma autópsia geral que incluirá o exame da superfície exterior do corpo, de todos os orifícios e das cavidades craniana, torácica e abdominal e respectivos conteúdos. O fígado, os rins, as glândulas supra-renais e os testículos serão pesados, ainda húmidos, o mais rapidamente possível depois da dissecação, para se evitar a perda de líquidos por evaporação. Os seguintes órgãos e tecidos deverão ser conservados num meio adequado na eventualidade de um exame histopatológico ulterior: todas as lesões macroscópicas, encéfalo, incluindo cortes da medula/protuberância, córtex cerebeloso e córtex cerebral, hipófise, tiróideia, paratiróideia, todo o tecido tímico, (traqueia), pulmões, coração, aorta, glândulas salivares, fígado, baço, rins, supra-renais, pâncreas, gónadas, útero, órgãos genitais anexos, vesícula biliar (quando presente), esófago, estômago, duodeno, jejuno, íleo, cego, cólon, recto, bexiga, gânglio linfático representativo, (glândula mamária na fêmea), (musculatura da coxa), nervo periférico, (olhos), (esterno com medula óssea), (fémur, incluindo superfície articular), (medula espinhal a três níveis: cervical, mediotorácica e lombar) e (glândulas lacrimais). Os tecidos mencionados entre parênteses só serão examinados em caso de aparecimento de sinais de toxicidade ou de compromisso do órgão-alvo.

Exame histopatológico

a) Serão objecto de um exame histopatológico completo a pele normal e a pele tratada, assim como os órgãos e tecidos de todos os animais de controlo e do grupo exposto à dose mais elevada;

b) Todas as lesões macroscópicas serão examinadas;

([1]) Conhecida actualmente por transaminase da alanina.
([2]) Conhecida actualmente por transaminase do aspartato.

▼B

c) Os órgãos-alvo dos animais pertencentes aos grupos tratados com outras doses deverão ser examinados;

d) Se se utilizarem ratos, os pulmões dos animais dos grupos expostos às doses baixa e intermédia serão submetidos a um exame histopatológico para se detectar qualquer sinal de infecção uma vez que isso nos permite uma avaliação conveniente do estado de saúde dos animais. Outros exames histopatológicos sistemáticos podem não se justificar para os animais desses grupos mas devem ser sempre efectuados aos órgãos que apresentem lesões no grupo tratado com a dose mais elevada;

e) Quando se usar um grupo satélite, será feito um exame histopatológico aos tecidos e órgãos que apresentem sinais de toxicidade nos grupos tratados.

2. **RESULTADOS**

Os resultados devem ser resumidos sob a forma de quadros, indicando, para cada grupo de experiência, o número de animais no início desta, o número de animais apresentando lesões, o tipo de lesões e a percentagem de animais apresentando cada tipo de lesão. Os resultados serão avaliados por meio de um método estatístico apropriado. Pode utilizar-se qualquer método estatístico reconhecido.

3. **RELATÓRIO**

3.1. RELATÓRIO DO TESTE

O relatório do teste deverá incluir as seguintes informações:

— espécie, estirpe, origem, condições do meio ambiente, dieta,

— doses (compreendendo veículo, se utilizado) e concentrações,

— resposta tóxica por sexo e por dose,

— dose sem efeitos, se possível,

— momento de morte durante a experiência ou indicação dos animais sobreviventes no fim da experiência,

— descrição dos efeitos tóxicos ou outros,

— momento da observação de qualquer manifestação anormal e sua evolução,

— dados relativos à alimentação e peso do animal,

— observações oftalmológicas,

— exames hematológicos efectuados e seus resultados,

— testes bioquímicos clínicos utilizados e seus resultados (incluindo resultados das análises de urina),

— resultados da autópsia,

— descrição pormenorizada de todas as observações histopatológicas,

▼B

— tratamento estatístico dos resultados, se possível,

— discussão dos resultados,

— interpretação dos resultados,

— condições experimentais.

3.2. AVALIAÇÃO E INTERPRETAÇÃO

Ver Introdução Geral, parte B.

4. **REFERÊNCIAS**

Ver Introdução Geral, parte B.

▼M4

B.29. TOXICIDADE SUBCRÓNICA POR INALAÇÃO: ESTUDO DE 90 DIAS

RESUMO

Este método B.29 revisto visa caracterizar integralmente a toxicidade por via inalatória do produto químico estudado, após um período de duração subcrónica (90 dias), e obter dados sólidos para quantificar os riscos por inalação. Expõem-se durante 90 dias (13 semanas), seis horas por dia, grupos constituídos por dez roedores machos e dez roedores fêmeas a três ou mais concentrações do produto químico em estudo (a), a ar filtrado (b, controlo negativo), e/ou ao veículo (c, controlo do veículo). Em geral, Os animais são expostos durante cinco dias por semana, mas admite-se que sejam expostos sete dias por semana. Ensaiam-se sempre machos e fêmeas, mas cada sexo pode ser exposto a concentrações diferentes, se um deles for reconhecidamente mais sensível ao produto químico do que o outro. Este método concede ao diretor do estudo flexibilidade suficiente para incluir grupos satélites (para apreciação da reversibilidade), eutanásias intercalares, lavagens broncoalveolares, testes neurológicos e exames histopatológicos e de patologia clínica suplementares, a fim de melhor caracterizar a toxicidade do produto químico em estudo.

INTRODUÇÃO

1. Este método é equivalente ao *Test Guideline* 413 (2009) da OCDE. O *Test Guideline* 413 (TG 413) inicial relativo à toxicidade subcrónica por inalação foi adotado em 1981 (1). O presente método B.29 é equivalente ao método TG 413 revisto (2009), tendo sido atualizado para refletir o estado da ciência e cumprir exigências atuais e futuras da regulamentação.

2. Os estudos de toxicidade subcrónica por inalação destinam-se principalmente a aferir das concentrações que a regulamentação deve prever para a avaliação dos riscos a que os trabalhadores estão sujeitos no local de trabalho. São igualmente utilizados para avaliar os riscos de exposição humana nos locais de habitação, associados aos meios de transporte e no ambiente. O método permite caracterizar os efeitos adversos resultantes da exposição diária por inalação, durante 90 dias (cerca de 10 % do tempo de vida do rato), ao produto químico em estudo. Os dados provenientes dos estudos de toxicidade subcrónica por inalação podem utilizar-se para quantificar riscos e para selecionar as concentrações a utilizar em estudos de toxicidade crónica. O presente método não se destina especificamente ao ensaio de nanomateriais. No final do capítulo e no documento de orientações n.º 39 (2) definem-se alguns conceitos utilizados neste método.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

3. A fim de melhorar a qualidade do estudo e de minimizar a utilização a animais, antes de realizar o estudo o laboratório de ensaios deve ponderar todas as informações disponíveis sobre o produto químico em causa. Entre os elementos úteis para a escolha das concentrações mais adequadas contam-se a identidade, a estrutura química e as propriedades físico-químicas do produto químico em estudo, resultados de ensaios de toxicidade *in vitro* ou *in vivo*, as utilizações previstas, o potencial de exposição humana, dados (Q)SAR — "*(quantitative) structure-activity relationships*", relações (quantitativas) estrutura/atividade — e toxicológicos disponíveis sobre produtos químicos estruturalmente afins e dados provenientes de outros estudos de exposição repetida. Se estiver prevista a ocorrência ou ocorrerem manifestações de neurotoxicidade durante o estudo, fica ao critério do diretor deste incluir no estudo as avaliações suplementares que considere adequadas, tais como uma bateria de observações funcionais e determinações da atividade motora. Embora o momento da exposição possa ser um aspeto crítico em determinados exames, a realização destes estudos suplementares não deve interferir na conceção do estudo principal.

▼M4

4. No caso dos produtos químicos corrosivos ou irritantes, podem ensaiar-se diluições adequadas, a concentrações que gerem o grau de toxicidade pretendido. Para mais informações, ver o documento de orientações n.º 39 (2). Ao expor animais a produtos químicos com tais características, as concentrações visadas devem ser suficientemente baixas para não causarem dor ou sofrimento intensos, sem deixarem de ser suficientes para que a curva de resposta à concentração abranja os níveis correspondentes aos objetivos do ensaio, nos planos científico e da regulamentação. Estas concentrações devem ser adaptadas a cada caso, de preferência com base num estudo exploratório convenientemente concebido, que forneça informações sobre o parâmetro crítico, eventuais limiares de irritação e o momento do aparecimento dos efeitos (ver os pontos 11 a 13). É necessário justificar as concentrações escolhidas em cada caso.

5. Os animais moribundos ou que apresentem sinais óbvios de dor ou de grande sofrimento continuado devem ser eutanasiados. Os animais moribundos são equiparados aos que morrem durante o ensaio. O documento de orientações da OCDE relativo aos parâmetros eticamente mensuráveis (3) define os critérios que devem presidir à decisão de eutanasiar animais moribundos ou em grande sofrimento, bem como orientações sobre o reconhecimento da morte previsível ou iminente.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Escolha da espécie animal

6. Devem ser utilizados roedores adultos, jovens e saudáveis de estirpes laboratoriais de uso corrente. A espécie preferida é o rato. É necessário justificar o recurso a outras espécies.

Preparação dos animais

7. As fêmeas utilizadas devem ser nulíparas e não podem estar grávidas. No dia da seleção aleatória, os animais devem ser adultos jovens com sete a nove semanas, de peso corporal não desviado mais de 20 % do peso médio correspondente a cada sexo. Selecionam-se os animais aleatoriamente, marcam-se para identificação individual e mantêm-se nas suas gaiolas durante, pelo menos, cinco dias antes do início do ensaio, para aclimatação às condições laboratoriais.

Manutenção dos animais

8. É necessário identificar individualmente cada animal, de preferência com um respondedor (*transponder*) subcutâneo, para facilitar as observações e evitar confusões. A temperatura do biotério deve ser de 22 °C ± 3 °C. O ideal será manter a humidade relativa entre 30 % e 70 %, embora isto possa não ser possível ao utilizar água como veículo. Antes e depois das exposições, os animais são geralmente engaiolados por sexo e por concentração, mas o número de animais por gaiola não deve dificultar a clara observação de cada animal e deve minimizar as perdas devidas a lutas ou canibalismo. Quando se opta pela exposição unicamente nasal dos animais, pode ser necessário aclimatá-los aos tubos de contenção. Estes não devem provocar aos animais tensões físicas, térmicas ou dinâmicas excessivas. A contenção dos animais pode afetar parâmetros fisiológicos como a temperatura corporal (hipertermia) e/ou o volume respirado por minuto. Caso se disponha de dados genéricos reveladores de que nenhuma destas alterações ocorre em grau apreciável, não será necessária a adaptação prévia aos tubos de contenção. Os animais cujo corpo seja exposto na totalidade a um aerossol devem permanecer em gaiolas individuais durante a exposição, para evitar que o aerossol seja filtrado pela pelagem dos que com eles coabitem. Exceto nos períodos de exposição, podem utilizar-se dietas convencionais certificadas de laboratório, com fornecimento ilimitado de água potável da rede pública. A iluminação deve ser artificial, com uma sequência de 12 horas de luz seguidas de 12 horas de escuridão.

▼M4

Câmaras de inalação

9. Ao escolher-se a câmara de inalação, deve ter-se em conta a natureza do produto químico em estudo e o objetivo do ensaio. Privilegia-se o modo de exposição unicamente nasal, termo que abrange as exposições "unicamente da cabeça", "unicamente do nariz" e "unicamente do focinho". A exposição unicamente nasal é geralmente preferida no estudo de aerossóis de líquidos ou de sólidos, ou de vapores que possam condensar-se e formar aerossóis. Para determinados objetivos do estudo, poderá ser melhor recorrer ao modo de exposição de corpo inteiro, mas será necessário justificá-lo no relatório. Para garantir estabilidade atmosférica nas câmaras de corpo inteiro, o volume de todos os animais presentes em cada câmara não deve exceder 5 % do volume da câmara. O documento GD 39 (2) descreve os princípios, vantagens e desvantagens das técnicas de exposição unicamente nasal e de corpo inteiro.

ESTUDOS DA TOXICIDADE

Concentrações-limite

10. Contrariamente aos estudos de toxicidade aguda, nos estudos de toxicidade subcrónica por inalação não está definida nenhuma concentração-limite. Na escolha da concentração máxima a ensaiar, deve ter-se em conta a concentração máxima atingível, o nível de exposição humana mais desfavorável, a necessidade de manter um fornecimento adequado de oxigénio e/ou considerações de bem-estar animal. Se os dados disponíveis não permitirem estabelecer limites, podem utilizar-se os valores-limite de exposição aguda fixados no Regulamento (CE) n.º 1272/2008 (13) — concentração máxima até 5 mg/l para aerossóis, 20 mg/l para vapores e 20 000 ppm para gases; ver igualmente o GD 39 (2). Se for necessário exceder estes limites ao ensaiar gases ou produtos químicos muito voláteis (por exemplo, refrigerantes), haverá que justificá-lo. A concentração-limite deve induzir efeitos tóxicos inequívocos sem gerar tensões desnecessárias nos animais nem afetar a longevidade dos mesmos (3).

Estudo exploratório

11. Antes de iniciar o estudo principal, é geralmente necessário realizar um estudo exploratório. Um estudo exploratório com as características aqui definidas é mais completo do que um estudo preliminar, por não se limitar à escolha das concentrações. O êxito do estudo principal pode depender dos conhecimentos adquiridos num estudo exploratório. Este pode, por exemplo, fornecer informações técnicas sobre métodos de análise, granulometria, mecanismos de toxicidade, dados histopatológicos e de patologia clínica e estimativas do nível sem observação de efeitos adversos (NOAEL) e da concentração máxima tolerada no estudo principal. Fica ao critério do diretor do estudo recorrer a um estudo exploratório para determinar o limite mínimo de irritação do aparelho respiratório (por exemplo, por meio de uma histopatologia do aparelho respiratório, de testes da função pulmonar ou de uma lavagem broncoalveolar), a concentração máxima que os animais toleram sem tensões excessivas e os parâmetros que melhor caracterizam a toxicidade do produto químico em estudo.

12. O estudo exploratório pode abranger uma ou mais concentrações. Consoante os parâmetros escolhidos, devem expor-se a cada concentração três a seis machos e três a seis fêmeas. A duração deste estudo varia entre cinco dias, no mínimo, e geralmente não mais de 28 dias. É necessário justificar no relatório as concentrações escolhidas para o estudo principal. O objetivo deste último é demonstrar a existência de uma relação entre a concentração e a resposta obtida para o parâmetro previsivelmente mais sensível. Idealmente, a concentração mais baixa deve ser a concentração sem efeitos adversos observáveis e a concentração mais alta deve induzir efeitos tóxicos inequívocos, sem gerar tensões desnecessárias nos animais nem afetar a longevidade dos mesmos (3).

▼M4

13. Ao escolher os níveis de concentração para o estudo exploratório, devem ponderar-se todas as informações disponíveis, incluindo relações estrutura-atividade e dados relativos a produtos químicos semelhantes (ver o ponto 3). O estudo exploratório pode confirmar ou refutar a escolha dos parâmetros mais sensíveis segundo critérios mecanísticos, por exemplo, a inibição da colinesterase por organofosfatos, a formação de meta-hemoglobina por agentes eritrocitotóxicos, as hormonas tiroideias (T_3 e T_4), no caso dos agentes tirotóxicos, proteínas, a LDH, ou a presença de neutrófilos na lavagem broncoalveolar, no caso de partículas inócuas fracamente solúveis ou de aerossóis irritantes dos pulmões.

Estudo principal

14. Um estudo principal de toxicidade subcrónica compreende geralmente três níveis de concentração, bem como, em paralelo, os controlos negativo (do ar) e/ou do veículo (ver o ponto 18). Para facilitar a seleção dos níveis de exposição, devem ser utilizados todos os dados disponíveis, nomeadamente resultados de estudos de toxicidade sistémica, metabólicos e cinéticos (deve ter-se especial cuidado em evitar níveis de concentração elevados que saturem os processos cinéticos). Cada grupo de ensaio compreende a exposição de dez roedores machos e dez roedores fêmeas ao produto químico em estudo, durante seis horas por dia e cinco dias por semana, ao longo de treze semanas (a duração total do estudo é, pelo menos, de 90 dias). Os animais também podem ser expostos sete dias por semana (por exemplo, ao ensaiar produtos farmacêuticos inalados). Se um dos sexos for reconhecidamente mais sensível ao produto químico em estudo, pode expor-se cada sexo a concentrações diferentes das utilizadas para o outro, a fim de otimizar a resposta à concentração como se refere no ponto 15. Se espécies que não o rato forem sujeitas a exposição unicamente nasal, pode ajustar-se a duração máxima da exposição para minimizar a tensão gerada na espécie em causa. Se a duração da exposição for inferior a seis horas por dia ou se for necessário realizar um estudo de exposição de longa duração (por exemplo, 22 horas por dia) de corpo inteiro [ver o GD 39 (2)], será necessário justificá-lo. Durante o período de exposição, a alimentação deve ser suspensa, exceto se a exposição exceder seis horas. Durante as exposições de corpo inteiro pode continuar a fornecer-se água.

15. As concentrações visadas escolhidas devem permitir identificar o(s) órgão(s)-alvo e evidenciar uma relação clara entre a concentração e a resposta obtida:

— o nível de concentração mais elevado deve gerar efeitos tóxicos, mas não causar sintomas deletérios nem mortalidade, que impediriam a interpretação dos resultados,

— o espaçamento do nível ou níveis de concentração intermédios deve permitir uma gradação dos efeitos tóxicos entre os correspondentes aos das concentrações mais baixa e mais elevada,

— o nível de concentração mais baixo não deve ter efeitos tóxicos ou, se os tiver, estes devem ser reduzidos.

Eutanásias intercalares

16. Caso esteja prevista no estudo a realização de eutanásias intercalares, os efetivos expostos a cada nível de concentração devem ser aumentados no número de animais a eutanasiar antes da conclusão do estudo. É necessário fundamentar a realização de eutanásias intercalares e as análises estatísticas devem tê-las devidamente em conta.

▼M4

Estudo de grupos satélites (para apreciação da reversibilidade)

17. Pode recorrer-se a um estudo satélite para observar a reversibilidade, a persistência ou o aparecimento diferido de efeitos tóxicos durante um período adequado, não inferior a 14 dias, após o termo da exposição. Compõem estes grupos dez machos e dez fêmeas, que são expostos ao mesmo tempo que os animais ensaiados no estudo principal. Os animais dos grupos satélites são expostos à concentração mais elevada do produto químico em estudo e devem ser complementados pelos grupos necessários de controlo do ar e/ou do veículo em paralelo (ver o ponto 18).

Animais de controlo

18. Os animais de controlo negativo (do ar) em paralelo devem ser tratados do mesmo modo que os animais dos grupos que participam no ensaio principal, exceto que são expostos a ar filtrado em vez de ao produto químico em estudo. Se for utilizada água ou outra substância para gerar a atmosfera ensaiada, deve incluir-se no estudo, em vez do grupo de controlo negativo (do ar), um grupo de controlo do veículo. Sempre que possível, o veículo utilizado deve ser água. Se assim for, os animais são expostos a controlo a ar com a mesma humidade relativa que o ar utilizado para os grupos expostos ao produto químico em estudo. A escolha do veículo mais adequado deve basear-se em dados históricos ou num estudo prévio convenientemente realizado. Se não se conhecer bem a toxicidade do veículo, fica ao critério do diretor do estudo utilizar em simultâneo um controlo negativo (do ar) e um controlo do veículo, embora se desaconselhe fortemente este procedimento. Se os dados históricos revelarem que o veículo não é tóxico, não haverá necessidade de um grupo de controlo negativo (do ar) e apenas deve utilizar-se um controlo do veículo. Se um estudo prévio de um produto químico incorporado num determinado veículo não revelar toxicidade, conclui-se que o veículo em causa não é tóxico à concentração ensaiada, devendo utilizar-se esse controlo do veículo.

CONDIÇÕES DE EXPOSIÇÃO

Administração das concentrações

19. Os animais são expostos ao produto químico em estudo sob a forma de gás, vapor, aerossol ou de uma mistura destes. O estado físico a ensaiar depende das propriedades físico-químicas do produto químico em estudo, das concentrações escolhidas e/ou da forma física cuja probabilidade de presença durante a manipulação e utilização do mesmo seja maior. Os produtos químicos higroscópicos ou quimicamente reativos devem ser ensaiados em atmosfera seca. Devem tomar-se precauções para evitar concentrações que possam provocar explosões. As matérias em partículas podem ser sujeitas a processos mecânicos para reduzir a granulometria. Para mais orientações, consultar o documento GD 39 (2).

Distribuição granulométrica

20. Os aerossóis e os vapores que possam condensar-se em aerossóis devem ser objeto de análise granulométrica. Para que todas as zonas pertinentes do aparelho respiratório sejam expostas, recomenda-se a utilização de aerossóis com diâmetro aerodinâmico mediano da massa (MMAD) compreendido entre 1 μm e 3 μm e desvio-padrão geométrico (σ_g) compreendido entre 1,5 e 3,0 (4). Deve fazer-se o razoavelmente possível para respeitar estas condições, sendo necessário um parecer especializado caso isso não se consiga. Por exemplo, as partículas dos fumos metálicos são mais pequenas do que o limite inferior indicado, ao passo que as partículas carregadas e as fibras podem exceder o limite superior.

▼M4

Incorporação do produto químico em estudo num veículo

21. Idealmente, o produto químico em estudo deve ser ensaiado sem que tenha sido incorporado num veículo. Se for necessário utilizar um veículo para obter a concentração e a granulometria adequadas do produto químico em causa, deve preferir-se a água. Se o produto químico for dissolvido num veículo, será necessário comprovar que se mantém estável.

MONITORIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXPOSIÇÃO

Caudal de ar nas câmaras

22. Durante cada exposição, é necessário regular cuidadosamente, monitorizar continuamente e registar pelo menos de hora a hora o caudal de ar através de cada câmara. A monitorização em tempo real da concentração (ou estabilidade no tempo) da atmosfera em estudo constitui uma medida permanente de todos os parâmetros dinâmicos e um meio indireto de regular os que têm importância para a inalação. Se a concentração for monitorizada em tempo real, pode reduzir-se a frequência da medição do caudal de ar a apenas uma medição diária por exposição. É necessário ter especial cuidado em evitar reinalações nas câmaras de exposição unicamente nasal. A concentração de oxigénio não deve ser inferior a 19 % e a concentração de dióxido de carbono não deve exceder 1 %. Se houver razões para crer que estas concentrações não são respeitadas, é necessário medi-las. Se as medições efetuadas no primeiro dia de exposição mostrarem que as concentrações destes gases estão aos níveis corretos, não é necessário voltar a medi-las.

Temperatura e humidade relativa nas câmaras

23. Deve manter-se a temperatura nas câmaras a 22 °C ± 3 °C. Tanto no caso das exposições unicamente nasais como das exposições do corpo inteiro, é necessário monitorizar continuamente a humidade relativa na zona de respiração dos animais e, se possível, registá-la de hora a hora durante cada exposição. É preferível manter a humidade relativa entre 30 % e 70 %, mas isso pode não ser possível (por exemplo, quando se estudam misturas aquosas) ou pode não ser mensurável (devido a interferências do produto químico em estudo com o método de ensaio).

Concentração nominal do produto químico em estudo

24. Sempre que possível, deve calcular-se e registar-se a concentração nominal na câmara de exposição. Esta é dada pela divisão da massa gerada do produto químico em estudo pelo volume de ar total que circulou pelo sistema da câmara de inalação. A concentração nominal não é utilizada para caracterizar a exposição dos animais, mas a sua comparação com a concentração real dá uma indicação da eficácia de geração do sistema de ensaio, podendo ser utilizada para detetar problemas a esse nível.

Concentração real do produto químico em estudo

25. Entende-se por "concentração real do produto químico em estudo", a concentração do produto químico nas amostras colhidas na zona de respiração dos animais da câmara de inalação. As concentrações reais podem determinar-se por métodos específicos (por exemplo, amostragem direta ou métodos de adsorção ou de reação química e posterior caracterização analítica) ou por métodos inespecíficos, tais como gravimetria após filtração. O método gravimétrico só é aceitável para aerossóis de pós com um único componente ou de líquidos pouco voláteis e deve apoiar-se em caracterizações adequadas específicas do produto químico em causa efetuadas antes da

▼M4

realização do estudo. A concentração de aerossóis de pós com vários componentes também pode determinar-se por gravimetria. Todavia, são necessários para isso dados analíticos que demonstrem que a composição do produto transportado no aerossol é semelhante à do produto inicial. Se não se dispuser desses dados, pode ser necessário reanalisar periodicamente o produto químico em estudo (idealmente no aerossol) durante o ensaio. No caso dos agentes aerossolizados que possam evaporar-se ou sublimar, é necessário demonstrar que todas as fases são recolhidas pelo método escolhido.

26. Deve utilizar-se, se possível, apenas um lote do produto químico em estudo durante os ensaios e a amostra em estudo deve ser conservada em condições que preservem a sua pureza, homogeneidade e estabilidade. Antes de iniciar o estudo, deve caracterizar-se o produto químico em causa no que respeita à sua pureza e, se tecnicamente viável, à sua identidade e às quantidades dos contaminantes e impurezas nele identificados. Para o efeito, pode recorrer-se, entre outros, aos seguintes dados: tempos de retenção e áreas relativas de picos, pesos moleculares obtidos por espetrometria de massa ou cromatografia em fase gasosa ou outras estimativas. Embora a identidade da amostra a estudar não seja da responsabilidade do laboratório, pode ser aconselhável que este confirme, pelo menos, alguns aspetos da caracterização efetuada pelo cliente (cor, natureza física, etc.).

27. Deve manter-se a atmosfera de exposição tão constante quanto possível. Para demonstrar a estabilidade das condições de exposição, pode utilizar-se um dispositivo de monitorização em tempo real, tal como um fotómetro de aerossóis, para esses casos, ou, para vapores, um analisador de hidrocarbonetos totais. Deve medir-se a concentração real na câmara pelo menos três vezes por nível de exposição, em cada dia de exposição. Se isso não for viável, por limitações relacionadas com o caudal de ar ou devido a concentrações baixas, aceita-se uma amostra por período de exposição. Idealmente, essa amostra deve então ser colhida ao longo de todo o período de exposição. A concentração na câmara correspondente a uma determinada amostra não deve desviar-se da concentração média na câmara mais de 10 %, no caso de gases e vapores, nem mais de 20 %, no caso de aerossóis de líquidos ou de sólidos. Deve calcular-se e indicar-se no relatório o tempo necessário para a câmara atingir o equilíbrio (t_{95}). A duração da exposição corresponde ao tempo de geração do produto químico em estudo, incluído o tempo necessário para a câmara atingir o equilíbrio (t_{95}) e para o decaimento da concentração. O documento GD 39 (2) contém orientações para a estimativa do t_{95}.

28. No caso de misturas muito complexas de gases ou vapores e de aerossóis (por exemplo, atmosferas de combustão e produtos químicos gerados por produtos ou dispositivos finais específicos), o comportamento de cada fase na câmara de inalação pode ser diferente. Por esse motivo, deve escolher-se em cada fase (gás ou vapor e aerossol) pelo menos uma substância indicadora (substância analisada), normalmente o principal ingrediente ativo da mistura. Se o produto químico em estudo for uma mistura, deve indicar-se no relatório a concentração analítica correspondente à mistura e não apenas a concentração correspondente ao ingrediente ativo ou à substância indicadora (substância analisada) em causa. O documento GD 39 (2) contém mais informações sobre as concentrações reais.

Distribuição granulométrica do produto químico em estudo

29. Deve determinar-se a distribuição granulométrica dos aerossóis pelo menos semanalmente por nível de concentração, recorrendo a um impactor de cascata ou a outro instrumento, tal como um granulómetro aerodinâmico. Se for possível demonstrar a equivalência dos resultados obtidos pelo impactor de cascata e pelo instrumento alternativo, pode utilizar-se este último em todo o estudo.

▼M4

30. Em paralelo ao instrumento primário, deve utilizar-se um segundo dispositivo, tal como um filtro gravimétrico ou um borbulhador de gás/impactor *impinger*, para confirmar a eficiência de captação do primeiro. As concentrações mássicas obtidas por análise granulométrica e por análise com filtros não devem diferir entre si mais do que valores razoáveis [ver o GD 39 (2)]. Se for possível demonstrar esta equivalência, a todas as concentrações ensaiadas, no início do estudo, não é necessário efetuar mais medições de confirmação. Por razões de bem-estar animal, devem tomar-se medidas para minimizar dados inconclusivos que possam obrigar à repetição do estudo.

31. É necessário efetuar uma análise granulométrica no caso dos vapores que possam condensar-se para formar aerossóis ou se forem detetadas partículas numa atmosfera de vapores suscetível de formar fases mistas.

EXAMES

32. Os animais devem ser examinados clinicamente antes, durante e depois do período de exposição. Consoante a resposta dos animais durante a exposição, pode ser conveniente aumentar a frequência dos exames. Se for difícil examinar os animais devido aos tubos de contenção utilizados, à reduzida iluminação das câmaras de corpo inteiro ou à opacidade da atmosfera, deve-se examiná-los cuidadosamente depois da exposição. Os exames realizados antes da exposição do dia seguinte podem apreciar a eventual reversibilidade ou intensificação dos efeitos tóxicos.

33. Todos os exames devem ser registados, mantendo registos individuais para cada animal. Se forem eutanasiados animais ou forem encontrados animais mortos, deve registar-se o momento da morte com a maior exatidão possível.

34. Os exames a efetuar aos animais engaiolados devem incidir, nomeadamente, nas alterações da pele e da pelagem, dos olhos e das mucosas, do aparelho respiratório, do sistema circulatório, do sistema nervoso, da atividade somatomotora e do comportamento. Deve estar-se atento a tremores, convulsões, salivação, diarreia, letargia, sono e coma. A medição da temperatura retal pode corroborar uma bradipneia reflexa ou uma hipo/hipertermia relacionadas com a exposição ou com o confinamento. Entre as avaliações suplementares que podem incluir-se no protocolo de estudo contam-se as de parâmetros cinéticos ou ao nível da biomonitorização, da função pulmonar, da retenção de matérias fracamente solúveis acumuladas no tecido pulmonar e de alterações comportamentais.

PESO CORPORAL

35. Regista-se o peso de cada animal pouco antes da primeira exposição (dia 0) e, em seguida, duas vezes por semana (por exemplo, às sextas-feiras e às segundas-feiras, para verificar a recuperação durante o fim de semana sem exposição, ou intervaladas de modo a possibilitar a avaliação da toxicidade sistémica), bem como no momento da morte ou da eutanásia. Se não se registarem efeitos nas quatro primeiras semanas, durante o resto do estudo podem medir-se os pesos corporais apenas uma vez por semana. Os animais que integram os (eventuais) grupos satélites (para apreciação da reversibilidade) devem continuar a ser pesados semanalmente durante o período de recuperação. No termo do estudo, pesa-se cada animal pouco antes de ser eutanasiado, para não falsear o cálculo da relação entre o peso de cada órgão e o peso corporal.

CONSUMO DE ALIMENTOS E DE ÁGUA

36. Mede-se semanalmente o consumo de alimentos, podendo também medir-se o consumo de água.

▼M4

PATOLOGIA CLÍNICA

37. Efetua-se uma avaliação de patologia clínica a todos os animais depois de eutanasiados, incluindo os dos grupos de controlo e dos grupos satélites (para apreciação da reversibilidade). Regista-se o lapso de tempo entre o termo da exposição e a colheita de sangue, em especial quando a reconstituição do parâmetro visado é rápida. Recomenda-se que, após o termo da exposição, se colham amostras para análise dos parâmetros com tempo de meia-vida plasmático curto – por exemplo, a carboxi-hemoglobina (COHb), a colinesterase (CHE), e a meta-hemoglobina (MetHb).

38. Enumera-se no quadro 1 os parâmetros de patologia clínica normalmente exigidos nos estudos toxicológicos. A análise da urina não é exigida por rotina, mas pode efetuar-se quando a toxicidade prevista ou observada o aconselharem. Fica ao critério do diretor do estudo decidir avaliar outros parâmetros, para melhor caracterização da toxicidade do produto químico (por exemplo, colinesterase, lípidos, hormonas, equilíbrio ácido-base, meta-hemoglobina ou corpos de Heinz, creatinina-cinase, relação mieloide/ /eritroide, troponinas, gases no sangue arterial, lactato-desidrogenase, sorbitol-desidrogenase, glutamato-desidrogenase e gama-glutamil-transpeptidase).

Quadro 1

Parâmetros clássicos de patologia clínica

Hematologia	
Contagem de eritrócitos	Contagem total de leucócitos
Hematócrito	Fórmula leucocitária
Concentração de hemoglobina	Contagem de plaquetas
Hemoglobina corpuscular média	Potencial de coagulação (escolher um):
Volume corpuscular médio	— tempo de protrombina
Concentração de hemoglobina corpuscular média	— tempo de coagulação
Reticulócitos	— tempo de tromboplastina parcial

Química clínica	
Glucose (*)	Alanina-aminotransferase
Colesterol total	Aspartato-aminotransferase
Triglicéridos	Fosfatase alcalina
Azoto ureico no sangue	Potássio
Bilirrubina total	Sódio
Creatinina	Cálcio
Proteínas totais	Fósforo
Albumina	Cloretos
Globulina	

Análise da urina (facultativa)	
Aspeto (cor e turvação)	Proteínas totais
Volume	Glucose
Densidade ou osmolalidade	Sangue/células sanguíneas
pH	

(*) Dado que um período longo de jejum pode distorcer as determinações da glucose dos animais expostos relativamente aos animais dos grupos de controlo, fica ao critério do diretor do estudo fazer ou não os animais jejuar. Se a opção for por um período de jejum, este deve ser adaptado à espécie — no caso do rato, pode ser de 16 horas (jejum noturno). Pode determinar-se a glucose em jejum após jejum noturno durante a última semana de exposição ou após jejum noturno antes da autópsia (neste caso, juntamente com todos os outros parâmetros de patologia clínica).

▼M4

39. Se houver indícios de que a zona principal de deposição e retenção são as vias respiratórias inferiores (isto é, os alvéolos), a lavagem broncoalveolar pode ser a técnica mais adequada para efetuar uma análise quantitativa de parâmetros que hipoteticamente permitam avaliar a relação entre a dose e os efeitos por esta induzidos, com especial incidência para alveolites, inflamações pulmonares e fosfolipidose. Este processo permite estudar convenientemente os efeitos nos alvéolos das doses aplicadas e a evolução das lesões alveolares daí resultantes. Podem determinar-se no fluido da lavagem broncoalveolar a contagem total de leucócitos, a fórmula leucocitária, as proteínas totais e a lactato-desidrogenase. Outros parâmetros eventualmente a ponderar são os indicativos de alterações lisossómicas, fosfolipidose, fibrose, bem como de irritações e reações inflamatórias alérgicas, que podem compreender a determinação de citocinas ou quimiocinas pró-inflamatórias. As determinações no fluido proveniente da lavagem broncoalveolar complementam muitas vezes os exames histopatológicos, mas não os substituem. O documento GD 39 (2) contém orientações sobre a realização da lavagem pulmonar.

EXAME OFTALMOLÓGICO

40. Recorrendo a um oftalmoscópio ou a dispositivo equivalente, efetua-se um exame oftalmológico do fundo do olho, dos meios refrativos, da íris e da conjuntiva de cada animal antes de administrar o produto químico em estudo e, no termo do estudo, aos animais do grupo com a concentração mais elevada e dos grupos de controlo. Caso sejam detetadas alterações oculares, devem examinar-se os animais dos outros grupos, incluindo o grupo satélite (para apreciação da reversibilidade).

MACROPATOLOGIA E PESO DO ÓRGÃOS

41. Os animais utilizados nos ensaios (incluindo os que morrerem durante o ensaio ou que forem eutanasiados e retirados do estudo por razões de bem-estar animal) devem ser completamente sangrados (se possível) e sujeitos a uma autópsia macroscópica. Deve registar-se o lapso de tempo entre o termo da última exposição de cada animal e o momento em que o animal é eutanasiado. Se não for possível realizar a autópsia imediatamente depois de detetada a morte do animal, este deve ser refrigerado (não congelado) a uma temperatura suficientemente baixa para minimizar a autólise. As autópsias devem ser efetuadas o mais rapidamente possível, normalmente não mais de um ou dois dias após a morte. Registam-se todas as alterações patológicas macroscópicas de cada animal, prestando especial atenção às alterações do aparelho respiratório.

42. Enumeram-se no quadro 2 os órgãos e tecidos a conservar num meio adequado, durante a autópsia macroscópica, para os exames histopatológicos. A preservação dos órgãos e tecidos indicados entre parênteses retos e de quaisquer outros não indicados fica ao critério do diretor do estudo. Os órgãos indicados a **negrito** devem ser separados dos tecidos aderentes e pesados ainda húmidos o mais rapidamente possível depois da dissecação, para evitar que sequem. A tiroide e os epidídimos só devem pesar-se se for necessário, porque os instrumentos utilizados para separar os tecidos aderentes podem comprometer a avaliação histopatológica. Logo depois da autópsia, fixam-se os tecidos e órgãos em formalina a 10 % tamponada ou com outro fixador adequado. A remoção dos tecidos aderentes só deve realizar-se 24 a 48 horas depois, consoante o fixador utilizado.

▼M4

Quadro 2

Órgãos e tecidos a conservar durante a autópsia macroscópica

Glândulas suprarrenais	Esófago
Aorta	[Bolbo olfativo]
Medula óssea (e/ou uma punção recente)	**Ovários**
Encéfalo (incluindo secções dos hemisférios cerebrais, do cerebelo e da medula/protuberância anelar)	Pâncreas
	Glândulas paratiroides
Cego	Nervo periférico (ciático ou tibial), de preferência na vizinhança do músculo
Cólon	Hipófise
Duodeno	Próstata
[**Epidídimos**]	Reto
[Olhos (retina, nervo ótico) e pálpebras]	Glândulas salivares
Fémur e articulação rotular	Vesículas seminais
Vesícula biliar (se presente)	Pele
[Glândulas de Harder]	Medula espinal (cervical, mediotorácica e lombar)
Coração	**Baço**
Íleo	Esterno
Jejuno	Estômago
Rins	Dentes
[Glândulas lacrimais (extraorbitais]	**Testículos**
Laringe (secção em três níveis, incluindo a base da epiglote)	**Timo**
Fígado	**Tiroide**
Pulmões (secção de cada lobo a um só nível, incluindo os brônquios principais)	[Língua]
Gânglios linfáticos da região hilar dos pulmões, especialmente no caso de produtos químicos pouco solúveis que se apresentem sob a forma de partículas. Para exames e/ou estudos mais aprofundados de cariz imunológico, podem conservar-se outros gânglios linfáticos, nomeadamente os das regiões mediastinal, cervical/submandibular e/ou auricular.	Traqueia (secção pelo menos em dois níveis, incluindo uma secção longitudinal na carina e uma secção transversal)
	[Ureteres]
Gânglios linfáticos (distais relativamente à porta de entrada)	[Uretra]
Glândulas mamárias (nas fêmeas)	[Bexiga urinária]
Músculo (coxa)	**Útero**
Tecidos nasofaríngeos (secção pelo menos em quatro níveis, um dos quais compreendendo o canal nasofaríngeo e os tecidos linfáticos associados à mucosa nasal — "*nasal associated lymphoid tissue*", NALT).	Órgãos-alvo
	Todas as massas e lesões macroscópicas

▼M4

43. Removem-se os pulmões intactos, pesam-se e instila-se-lhes um fixador adequado, à pressão de 20 a 30 cm de coluna de água, para conservar a estrutura pulmonar (5) Secciona-se cada lobo a um só nível (incluindo os brônquios principais); caso se proceda a lavagem pulmonar, secciona-se o lobo não lavado em três níveis (não sequenciais).

44. Examinam-se pelo menos quatro níveis dos tecidos nasofaríngeos, um dos quais deve compreender o canal nasofaríngeo (5)(6)(7)(8)(9), para possibilitar um exame adequado do epitélio escamoso, de transição (respiratório não ciliado), respiratório (respiratório ciliado) e olfativo, assim como o tecido linfático adjacente — NALT (10)(11). Examinam-se três níveis da laringe, um dos quais deve incluir a base da epiglote (12). Examinam-se pelo menos dois níveis da traqueia, incluindo uma secção longitudinal na carina da bifurcação que dá origem aos brônquios extrapulmonares e uma secção transversal.

HISTOPATOLOGIA

45. Deve efetuar-se uma avaliação histopatológica dos órgãos e tecidos indicados no quadro 2 a cada animal do grupo com a concentração mais elevada e dos grupos de controlo, bem como aos animais que morrerem ou forem eutanasiados durante o estudo. Deve prestar-se especial atenção ao aparelho respiratório, aos órgãos-alvo e às lesões macroscópicas. Os órgãos e tecidos que apresentem lesões nos animais do grupo com a concentração mais elevada devem ser examinados em todos os grupos. Fica ao critério do diretor do estudo efetuar avaliações histopatológicas a outros grupos, para evidenciar uma resposta clara à concentração. Caso se tenha constituído um grupo satélite de animais (para apreciação da reversibilidade), deve efetuar-se o exame histopatológico dos tecidos e órgãos que tenham revelado alterações nos animais dos outros grupos expostos. Se o número de mortes prematuras ou outros problemas no grupo com a concentração mais elevada for excessivo, a ponto de comprometer a significância dos dados, efetua-se um exame histopatológico dos animais expostos ao nível de concentração imediatamente inferior. Deve procurar-se estabelecer correlações entre as observações macroscópicas e os resultados dos exames microscópicos.

DADOS E RELATÓRIOS

Dados

46. Devem apresentar-se dados por animal relativos a peso corporal, consumo alimentar, patologias clínicas, macropatologias, peso dos órgãos e histopatologias. Devem resumir-se os resultados dos exames clínicos num quadro, indicando, para cada grupo estudado, o número de animais utilizados, o número de animais que apresentaram sinais específicos de toxicidade, o número de animais que morreram durante o ensaio ou que foram eutanasiados e o momento da morte de cada animal, complementados por uma descrição dos efeitos tóxicos e da evolução e reversibilidade destes, bem como pelos resultados das autópsias. Os resultados, quantitativos ou descritivos, devem ser avaliados por um método estatístico adequado. Os métodos estatísticos devem ser escolhidos no planeamento do estudo, podendo sê-lo qualquer método estatístico corrente adequado.

Relatório dos ensaios

47. Elementos a constar, quando pertinente, do relatório dos ensaios:

Animais estudados e condições em que são mantidos

— descrição das condições de engaiolamento, nomeadamente: número (ou alteração do número) de animais por gaiola, camas, temperatura e humidade relativa ambientes, fotoperíodo e dieta,

▼M4

— espécie e estirpe utilizadas e, caso não sejam utilizados ratos, justificação da utilização de outra espécie. Podem apresentar-se dados originários da proveniência dos animais ou dados históricos, desde que correspondentes a animais sujeitos às mesmas condições de exposição, alojamento e jejum,

— número, idade e sexo,

— método de aleatorização,

— descrição de eventuais condicionamentos anteriores ao ensaio, nomeadamente ao nível da dieta, de quarentenas e do tratamento de doenças.

Produto químico em estudo

— natureza física, grau de pureza e propriedades físico-químicas pertinentes (incluindo a isomerização),

— dados de identificação e, se for conhecido, número de registo CAS (*Chemical Abstract Service*).

Veículo

— justificação da utilização e da escolha do veículo (se não for água),

— dados históricos ou paralelos demonstrativos de que o veículo não interfere nos resultados do estudo.

Câmaras de inalação

— descrição pormenorizada – incluindo o volume e um esquema – das câmaras de inalação,

— origem e descrição do equipamento utilizado na exposição dos animais e na geração da atmosfera,

— equipamento de medição da temperatura, humidade, granulometria e concentração real,

— fonte de ar e sistema de climatização utilizado,

— métodos utilizados para calibrar o equipamento a fim de garantir a homogeneidade da atmosfera ensaiada,

— subpressão ou sobrepressão,

— pontos de exposição por câmara (de exposição unicamente nasal); localização dos animais na câmara (câmara de exposição de corpo inteiro),

— estabilidade da atmosfera ensaiada,

— localização nas câmaras dos sensores térmicos e higrométricos e dos pontos de colheita de amostras da atmosfera ensaiada,

— tratamento do ar fornecido/evacuado,

— caudais de ar, caudal de ar em cada ponto de exposição (exposição unicamente nasal) ou relação entre o volume ocupado pelos animais e o volume da câmara (câmara de exposição de corpo inteiro),

— tempo necessário para as câmaras de inalação atingirem o equilíbrio (t95),

— número horário de substituições de volume,

— medidores (se existirem).

Elementos relativos à exposição

— fundamentação da escolha da concentração visada no estudo principal,

▼M4

— concentrações nominais (dadas pela divisão da massa do produto químico em estudo introduzido na câmara de inalação pelo volume de ar total que nela circulou),

— concentrações reais do produto químico em estudo obtidas na zona de respiração dos animais; no caso das misturas que geram formas físicas heterogéneas (gases, vapores, aerossóis), pode analisar-se separadamente cada uma delas,

— as concentrações no ar devem indicar-se em unidades de massa (mg/l, mg/m^3, etc.) e não de volume (ppm, ppb, etc.),

— distribuição granulométrica, diâmetro aerodinâmico mediano da massa (MMAD) e desvio-padrão geométrico (σ_g), incluindo os métodos de cálculo correspondentes; indicar também o resultado de cada análise granulométrica efetuada.

Condições de realização dos ensaios

— elementos sobre a preparação do produto químico estudado, nomeadamente sobre eventuais métodos de redução da granulometria de sólidos ou de preparação de soluções do produto químico,

— descrição (de preferência complementada por um esquema) do equipamento utilizado para gerar a atmosfera ensaiada e para expor os animais a essa atmosfera,

— elementos relativos ao equipamento de monitorização da temperatura, humidade e caudal de ar nas câmaras (curvas de calibração),

— elementos relativos ao equipamento utilizado para colher as amostras para determinação da granulometria e da concentração nas câmaras,

— elementos sobre o método de análise química utilizado e sobre a validação desse método (incluindo o rendimento da recuperação do produto químico em estudo do meio amostrado),

— método utilizado para distribuir aleatoriamente os animais pelos grupos ensaiados e pelos grupos de controlo,

— elementos sobre a qualidade dos alimentos e da água (incluindo o tipo de dieta e a origem desta, bem como a origem da água),

— fundamentação da escolha das concentrações utilizadas nos ensaios.

Resultados

— quadro com a temperatura, a humidade e o caudal de ar nas câmaras,

— quadro com as concentrações nominais e reais nas câmaras,

— quadro com os dados granulométricos, nomeadamente dados analíticos sobre a colheita de amostras, a distribuição granulométrica e os cálculos de MMAD e σ_g,

— quadro com os dados de resposta e as concentrações correspondentes a cada animal (animais que apresentaram sinais de toxicidade, incluindo mortalidade, e natureza, intensidade, momento do aparecimento e duração dos efeitos),

▼M4

— quadro com os pesos de cada animal,

— quadro dos consumos alimentares,

— quadro dos dados de patologia clínica,

— resultados da autópsia e resultados histopatológicos correspondentes a cada animal, se disponíveis.

Discussão e interpretação dos resultados

— deve ser dada especial atenção à descrição dos métodos utilizados para satisfazer os critérios deste método de ensaio, nomeadamente no que respeita à concentração-limite e à granulometria,

— examinar em que medida, com base nos resultados globais, as partículas são respiráveis, em especial se os critérios granulométricos não forem satisfeitos,

— a apreciação global do estudo deve incidir igualmente na coerência dos métodos utilizados para determinar as concentrações nominal e real e deve dar conta da relação entre estas concentrações,

— referir a causa provável da morte e o modo de ação predominante (sistémico ou local),

— explicar por que razão terá sido necessário eutanasiar animais que apresentavam sinais de dor ou de grande sofrimento continuado, com base nos critérios do documento de orientações da OCDE relativo aos parâmetros eticamente mensuráveis (3);

— identificar o(s) órgão(s)-alvo,

— determinar o NOAEL e o LOAEL (nível mínimo com observação de efeitos adversos).

REFERÊNCIAS:

(1) OCDE (1981). *Subchronic Inhalation Toxicity Testing*. Original Test Guideline No. 413. Environment Directorate, OCDE, Paris.

(2) OCDE (2009). *Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing.* Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39. ENV/JM/MONO(2009)28, OCDE, Paris.

(3) OCDE (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19. ENV/JM/MONO(2000)7, OCDE, Paris.

(4) Whalan J.E., Redden J.C. (1994). Interim Policy for Particle Size and Limit Concentration Issues in Inhalation Toxicity Studies. Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency.

(5) Dungworth D.L., Tyler W.S., Plopper C.E. (1985). Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology (Capítulo 9), *in Toxicology of Inhaled Material*. Witschi, H.P., Brain, J.D. (eds.). Springer Verlag Heidelberg, p. 229-258.

(6) Young J.T. (1981). Histopathological examination of the rat nasal cavity. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1:309-312.

(7) Harkema J.R. (1990). Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants. *Environ. Health Perspect.* 85:231-238.

▼**M4**

(8) Woutersen R.A., Garderen-Hoetmer A., van Slootweg P.J., Feron V.J. (1994). Upper respiratory tract carcinogenesis in experimental animals and in humans. *In* Waalkes M.P., Ward J.M. (eds.) Carcinogenesis. Target Organ Toxicology Series, Raven Press, New York, 215-263.

(9) Mery S., Gross E.A., Joyner D.R., Godo M., Morgan K.T. (1994). Nasal diagrams: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice. *Toxicol. Pathol.* 22:353-372.

(10) Kuper C.F., Koornstra P.J., Hameleers D.M.H., Biewenga J., Spit B.J., Duijvestijn A.M., Breda Vriesman van P.J.C., Sminia T. (1992). The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. *Immunol. Today* 13:219-224.

(11) Kuper C.F., Arts J.H.E., Feron V.J. (2003). Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue. *Toxicol. Lett.* 140-141:281-285.

(12) Lewis D.J. (1981). Mitotic Indices of Rat Laryngeal Epithelia. *Journal of Anatomy* 132(3):419-428.

(13) Regulamento (CE) n.º 1272/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16 de dezembro de 2008, relativo à classificação, rotulagem e embalagem de substâncias e misturas, que altera e revoga as Diretivas 67/548/CEE e 1999/45/CE, e altera o Regulamento (CE) n.º 1907/2006 (JO L 353 de 31.12.2008, p. 1).

▼**M4**

Apêndice 1

DEFINIÇÃO

Produto químico em estudo: qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado este método de ensaio.

▼M4

B.30. ESTUDOS DE TOXICIDADE CRÓNICA

INTRODUÇÃO

1. Este método é equivalente ao *Test Guideline* 452 (2009) da OCDE. O *Test Guideline* 452 (TG 452) inicial foi adotado em 1981. Entendeu-se necessário rever o método B.30 para dar conta da evolução recente no domínio do bem-estar animal e da regulamentação (1)(2)(3)(4). A atualização do método B.30 decorreu paralelamente à revisão dos capítulos B.32 ("Estudos de carcinogenicidade") e B.33 ("Estudos combinados de toxicidade crónica e carcinogenicidade") deste anexo. Visa-se obter mais dados a partir dos animais utilizados nos estudos e dispor de mais elementos para a escolha das doses. Este método foi concebido para o ensaio de uma vasta gama de produtos químicos, nomeadamente pesticidas e produtos químicos industriais.

2. Na sua maioria, os estudos de toxicidade crónica são efetuados em roedores. Este método destina-se, portanto, a ser aplicado, preferencialmente, a estudos em espécies de roedores. Caso seja necessário efetuar estudos noutras espécies, os princípios e procedimentos descritos neste método e no capítulo B.27 deste anexo — "Estudo de toxicidade oral de dose repetida em espécies não roedoras com a duração de 90 dias" (5) — podem igualmente ser aplicados, com as adaptações necessárias descritas no *Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies* (n.º 116) da OCDE (6).

3. As três vias principais de administração nos estudos de toxicidade crónica são a via oral, a via dérmica e a via inalatória. A via de administração escolhida depende das características físico-químicas do produto químico em estudo e da via predominante de exposição humana. O documento de orientações n.º 116 da OCDE (6) contém mais informações sobre a escolha da via de exposição.

4. Este método centra-se na exposição por via oral, que é a via habitualmente mais utilizada nos estudos de toxicidade crónica. Embora possa também ser necessário efetuar estudos de toxicidade crónica a longo prazo por via dérmica ou por inalação para avaliar o risco para a saúde humana e/ou isso possa mesmo ser exigido pela regulamentação aplicável, estas duas vias de exposição são bastante complexas do ponto de vista técnico e esses estudos têm de ser concebidos para cada caso concreto. Porém, no que diz respeito às recomendações relativas aos períodos de exposição, aos parâmetros clínicos e patológicos e a outros aspetos, o método aqui descrito para caracterização e avaliação da toxicidade crónica por administração oral pode constituir a base de um protocolo para estudos por inalação e/ou por via dérmica. A OCDE publicou orientações relativas ao estudo da administração de produtos químicos por inalação (6)(7) e por via dérmica (6). Para a conceção de estudos a longo prazo com exposição por via inalatória, recomenda-se especificamente a consulta dos capítulos B.8 (8) e B.29 (9) deste anexo e do documento de orientações da OCDE relativo a ensaios de toxicidade aguda por inalação (7). No caso dos ensaios por via dérmica, deve consultar-se o capítulo B.9 (10) deste anexo.

▼M4

5. Os estudos de toxicidade crónica fornecem informações sobre os perigos para a saúde que potencialmente podem advir da exposição repetida durante um período considerável do tempo de vida da espécie utilizada. Estes estudos fornecem informações sobre os efeitos tóxicos do produto químico em causa, os órgãos afetados e a possibilidade de acumulação. Podem igualmente servir para obter uma estimativa do nível sem observação de efeitos adversos ("*no observed adverse effect level*", NOAEL), com base na qual se podem estabelecer critérios de segurança para a exposição humana. Salienta-se a necessidade de um exame clínico cuidadoso dos animais, de modo a obter-se o máximo de informação possível.

6. Entre os objetivos dos estudos efetuados por este método contam-se os seguintes:

— identificação da toxicidade crónica de produtos químicos,

— identificação de órgãos afetados,

— caracterização de relações dose-resposta,

— determinação de níveis sem observação de efeitos adversos (NOAEL) ou ponto de partida para o estabelecimento de doses de referência,

— previsão de efeitos de toxicidade crónica aos níveis da exposição humana,

— obtenção de dados para verificação de hipóteses relativas a modos de ação (6).

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

7. Antes de efetuar um estudo com vista à caracterização e avaliação de um produto químico do ponto de vista toxicológico, o laboratório que efetuará os ensaios deve ponderar todas as informações disponíveis sobre o produto químico em causa, a fim de adaptar o estudo de modo a melhorar a eficiência da determinação do potencial de toxicidade crónica e para minimizar o recurso a animais. Entre os elementos que podem ser úteis na conceção do estudo contam-se a identidade, a estrutura química e as propriedades físico-químicas do produto químico em causa, informações disponíveis sobre o modo de ação, resultados de ensaios de toxicidade *in vitro* ou *in vivo*, as utilizações previstas, o potencial de exposição humana, dados (Q)SAR — "*(quantitative) structure-activity relationships*", relações (quantitativas) estrutura/atividade — e toxicológicos disponíveis sobre produtos químicos estruturalmente afins, dados toxicocinéticos disponíveis (dados cinéticos associados a uma dose única ou a doses múltiplas) e dados provenientes de outros estudos com exposição repetida. Só deve proceder-se à determinação da toxicidade crónica depois de obtidos dados de toxicidade preliminares provenientes de estudos de toxicidade com repetição da dose administrada durante 28 e/ou 90 dias. Deve ponderar-se uma abordagem faseada dos ensaios de toxicidade crónica no âmbito da avaliação global dos potenciais efeitos adversos na saúde do produto químico em estudo (11)(12)(13)(14).

8. Antes de iniciar o estudo, devem escolher-se, com base no plano experimental e nos objetivos estabelecidos, os métodos estatísticos mais adequados para a análise dos resultados. Entre outros aspetos a considerar, é necessário determinar se o tratamento estatístico deverá contemplar ajustamentos em função do grau de sobrevivência e que tipo de análise deve efetuar-se no caso da morte prematura de todos os animais de um ou mais grupos. Para orientações sobre as análises estatísticas mais adequadas e informação sobre as referências bibliográficas fundamentais dos métodos estatísticos internacionalmente reconhecidos, deve consultar-se o documento de orientações n.º 116 (6), assim como o documento de orientações n.º 35, relativo à análise e avaliação de estudos de toxicidade crónica e de carcinogenicidade (15).

▼M4

9. Ao realizar um estudo de toxicidade crónica, recomenda-se que sejam sempre seguidos os princípios e considerações orientadoras enunciados no *Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation* (n.º 19) da OCDE (16), nomeadamente os expressos no ponto 62 do mesmo, cuja tradução é a seguinte: *Nos estudos com repetição da dose administrada, se um animal evidenciar sinais clínicos progressivos da deterioração do seu estado, deve tomar-se uma decisão com conhecimento de causa sobre se deve ou não ser eutanasiado. Para isso, deve ponderar-se, nomeadamente, o valor das informações que seriam obtidas no caso de o animal continuar integrado no estudo, relativamente ao estado geral do mesmo. Caso se decida manter o animal no estudo, deve aumentar-se, tanto quanto necessário, a frequência dos exames que lhe são efetuados. Também é possível, sem prejudicar a finalidade do ensaio, suspender temporariamente a administração do produto químico em estudo — se isso reduzir a dor ou o sofrimento do animal — ou reduzir a dose administrada.*

10. Para orientações pormenorizadas sobre os princípios aplicáveis à escolha das doses para estudos de toxicidade crónica e de carcinogenicidade e uma discussão dos mesmos, recomenda-se a consulta do documento de orientações n.º 116 (6) e das publicações com as referências 17 e 18 do International Life Sciences Institute. A estratégia de base para escolha das doses depende do objetivo ou objetivos principais do estudo (ver o ponto 6). Para escolher doses adequadas, importa estabelecer um equilíbrio entre, por um lado, a identificação dos perigos em jogo e, por outro, a caracterização e importância das respostas às doses reduzidas. Este equilíbrio é especialmente necessário quando se realizam estudos combinados de toxicidade crónica e de carcinogenicidade (capítulo B.33 deste anexo) — ver o ponto 11.

11. Deve ponderar-se a oportunidade de efetuar um estudo combinado de toxicidade crónica e de carcinogenicidade (capítulo B.33 deste anexo), em vez de efetuar separadamente um estudo de toxicidade crónica (o presente método B.30) e um estudo de carcinogenicidade (capítulo B.32 deste anexo). O estudo combinado é mais favorável, em termos de tempo e de custos, do que dois estudos distintos e não prejudica a qualidade dos dados obtidos na etapa de toxicidade crónica nem na etapa de carcinogenicidade. Ao efetuar um estudo combinado de toxicidade crónica e de carcinogenicidade (capítulo B.33 deste anexo), é, porém, necessário prestar especial atenção aos princípios relativos à escolha das doses (pontos 9 e 20 a 25). Reconhece-se, porém, que determinadas regulamentações podem exigir a realização de estudos separados.

12. No final do capítulo e no documento de orientações n.º 116 (6) definem-se alguns conceitos utilizados neste método.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

13. Administra-se diariamente o produto químico em estudo a vários grupos de animais, em doses crescentes de grupo para grupo, normalmente durante doze meses, embora possam escolher-se períodos mais longos ou mais curtos em função das exigências da regulamentação (ver o ponto 33). Escolhe-se a duração do estudo de modo a ser suficientemente longa para que os eventuais efeitos de toxicidade acumulada se manifestem, mas sem que sejam perturbados por alterações ligadas ao envelhecimento dos animais. Se o período de exposição não for de doze meses, é necessário fundamentá-lo, sobretudo se a duração da exposição for mais curta. Normalmente, administra-se o produto químico por via oral, embora a via inalatória ou a via dérmica também possam ser adequadas. Pode estar prevista a realização de uma ou mais eutanásias intercalares, por exemplo, após três ou seis meses. Nesse caso, pode aumentar-se o número de grupos de animais em conformidade (ver o ponto 19). No decurso do período de administração do produto químico, deve verificar-se atentamente se os animais evidenciam sinais de toxicidade. Autopsia-se os animais que morrem ou são eutanasiados durante os ensaios. No final dos ensaios, eutanasiam-se e autopsia-se os animais sobreviventes.

▼M4

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Escolha da espécie animal

14. Este método trata, em especial, da caracterização e avaliação da toxicidade crónica em roedores (ver o ponto 2), embora determinadas regulamentações exijam estudos similares em não roedores. É necessário justificar a escolha da espécie. Se forem exigidos estudos de toxicidade crónica em espécies que não sejam de roedores, a conceção e realização desses estudos deve basear-se nos princípios descritos no presente método e no capítulo B.27 deste anexo – "Estudo de toxicidade oral de dose repetida em espécies não roedoras com a duração de 90 dias" (5). O documento de orientações n.º 116 (6) contém mais informações sobre a escolha da espécie e da estirpe.

15. Embora neste método se possa recorrer a outros roedores, como o ratinho, a espécie preferida é o rato. O rato e o ratinho constituem os modelos experimentais preferidos devido à sua longevidade relativamente reduzida, à sua utilização generalizada em estudos farmacológicos e toxicológicos, à sua sensibilidade à indução de tumores e à disponibilidade de estirpes suficientemente caracterizadas destas espécies. Em consequência disto, dispõe-se de numerosos dados sobre a fisiologia e patologia destes animais. Devem ser utilizados animais adultos, jovens e saudáveis de estirpes laboratoriais correntes. O estudo de toxicidade crónica deve ser realizado com animais da mesma estirpe e proveniência que os utilizados no estudo ou estudos preliminares mais curtos. As fêmeas utilizadas devem ser nulíparas e não podem estar grávidas.

Condições de alojamento e alimentação

16. Os animais podem ser alojados individualmente ou em pequenos grupos do mesmo sexo. É necessário justificar cientificamente a opção pelo alojamento individual (19)(20)(21). As gaiolas devem ser dispostas de forma a minimizar possíveis efeitos derivados do seu posicionamento. A temperatura do biotério deve ser de 22 °C ± 3 °C. A humidade relativa deve estar compreendida entre 50 % e 60 %, embora sejam aceitáveis valores compreendidos entre 30 %, no mínimo, e um valor máximo que, preferencialmente, não deve exceder 70 %, salvo durante os períodos de limpeza do biotério. A iluminação deve ser artificial, com uma sequência de 12 horas de luz seguidas de 12 horas de escuridão. Na alimentação, podem utilizar-se dietas convencionais de laboratório e deve ser fornecida água de beber sem restrições. A dieta deve satisfazer as necessidades nutricionais da espécie estudada. Os teores de contaminantes da dieta – resíduos de pesticidas, poluentes orgânicos persistentes, fitoestrogénios, metais pesados, micotoxinas e outros – podem influenciar os resultados dos ensaios e devem ser os mais baixos possíveis. É necessário obter periodicamente dados analíticos relativos aos teores de nutrientes e de contaminantes da dieta, pelo menos no início do estudo e quando se muda de lote. Estes dados devem constar do relatório final. É igualmente necessário dispor de dados analíticos da água de beber utilizada no estudo. Quando o produto químico em estudo é administrado por via alimentar, a escolha da dieta pode ser influenciada pela necessidade de nela misturar convenientemente esse produto químico e de satisfazer simultaneamente as exigências nutricionais dos animais.

Preparação dos animais

17. Os animais utilizados devem ser saudáveis e ter sido aclimatados às condições laboratoriais durante, pelo menos, sete dias e não devem ter participado em experiências anteriores. No caso dos roedores, a administração do produto químico em estudo deve iniciar-se logo que possível após o desmame e a aclimatação, de preferência antes de os animais completarem oito semanas. É necessário caracterizar a espécie, a estirpe, a proveniência, o sexo, o peso e a idade dos animais utilizados no estudo. No início do estudo, as diferenças de peso entre os animais de cada sexo devem ser mínimas, não se desviando mais de 20 % do peso médio de todos os

▼M4

animais de cada sexo nele utilizados. Distribuem-se aleatoriamente os animais pelos grupos de controlo e pelos grupos expostos. Depois da distribuição aleatória dos animais, a média de peso corporal não deve diferir significativamente de grupo para grupo de animais do mesmo sexo. Se houver diferenças com significado estatístico, os animais devem, se possível, ser redistribuídos aleatoriamente. Deve atribuir-se a cada animal um número de identificação único, com o qual o animal seja identificado por tatuagem, implantação de *microchip* ou outro método adequado.

PROCEDIMENTO

Número e sexo dos animais

18. Devem ser utilizados animais de ambos os sexos. O número de animais utilizados deve ser suficiente para que, no final do estudo, reste em cada grupo um número de animais que permita efetuar uma avaliação biológica e estatística aprofundada. Caso se utilizem roedores, normalmente cada grupo do mesmo sexo exposto a cada dose deve integrar, pelo menos, 20 animais; caso não se utilizem roedores, recomenda-se que o número mínimo seja de quatro animais do mesmo sexo por grupo, para cada dose. Nos estudos em ratinhos, pode ser necessário reforçar o número de animais em cada grupo, para cada dose, para poder realizar todas as determinações hematológicas previstas.

Eutanásias intercalares, grupos satélites e animais sentinelas

19. Caso se justifique do ponto de vista científico, pode prever-se a realização de eutanásias intercalares (pelo menos dez animais de cada grupo, de cada um dos sexos), por exemplo, ao fim de seis meses, para obter informações sobre a evolução das alterações toxicológicas, bem como dados mecanísticos. Caso já se disponha desses dados, obtidos em estudos de toxicidade por dose repetida realizados com o produto químico em causa, as eutanásias em questão podem não se justificar cientificamente. Podem também prever-se grupos satélites para verificar a reversibilidade de alterações toxicológicas induzidas pelo produto químico em estudo. Nesse caso, os grupos satélites restringir-se-ão, normalmente, à dose mais elevada em estudo e aos grupos de controlo. Pode ainda prever-se um grupo de animais sentinelas (habitualmente cinco animais de cada sexo) para verificar, se necessário, o aparecimento de doenças durante o estudo (22). Caso esteja prevista a realização de eutanásias intercalares ou a inclusão de grupos satélites ou sentinelas, o número de animais a utilizar no estudo deve ser aumentado no número de animais a eutanasiar antes do termo do mesmo. Normalmente, os animais em causa devem ser objeto dos mesmos exames, nomeadamente peso corporal, consumo de alimentos e de água, análises hematológicas e de química clínica e exames patológicos, que os animais participantes na etapa de toxicidade crónica do estudo principal, embora também possa prever-se (no caso dos grupos com destino a eutanásia intercalar) que as determinações se limitem a parâmetros fundamentais específicos, por exemplo, de neurotoxicidade ou de imunotoxicidade.

Grupos de dose e dosagens

20. O documento de orientações n.º 116 (6) contém orientações relativas a todos os aspetos relacionados com a escolha das doses e os intervalos entre estas. Devem ser utilizados, pelo menos, três doses e um controlo em paralelo, exceto nos casos em que se realiza um ensaio do limite (ver o ponto 27). As doses baseiam-se, normalmente, nos resultados de estudos exploratórios das doses ou de estudos de dose repetida por períodos mais curtos e devem atender aos dados toxicológicos e toxicocinéticos disponíveis sobre o produto químico em estudo ou produtos químicos afins.

▼M4

21. A menos que tal dose esteja limitada pelas características físico-químicas ou pelos efeitos biológicos do produto químico em estudo, normalmente escolhe-se para dose mais elevada o nível que permita identificar os principais órgãos afetados e os efeitos tóxicos principais sem causar sofrimento, efeitos tóxicos intensos, morbidez nem mortalidade. Tendo presente o referido no ponto 22, deve escolher-se para dose mais elevada uma dose que induza efeitos tóxicos, evidenciados, por exemplo, por uma redução (aproximadamente de 10 %) do ganho de peso corporal.

22. Todavia, consoante os objetivos do estudo (ver o ponto 6), pode escolher-se uma dose máxima inferior à que evidencia efeitos tóxicos, por exemplo, se essa dose induzir um efeito adverso preocupante, mas com pouca influência na longevidade ou no peso corporal dos animais. A dose máxima não deve exceder 1 000 mg por quilograma de peso corporal por dia (relativamente à dose-limite, ver o ponto 27).

23. Podem escolher-se doses e intervalos entre doses que permitam estabelecer uma relação dose-resposta e determinar um NOAEL ou outro resultado pretendido do estudo, por exemplo, uma dose de referência (ver o ponto 25) ao nível de dose mais baixo. Entre os fatores a ter em conta na escolha das doses mais baixas, contam-se o declive esperado da curva dose-resposta, as doses às quais podem ocorrer alterações importantes ao nível metabólico ou do modo da ação tóxica, o nível ao qual se prevê a ocorrência de um limiar e o nível ao qual se prevê fixar o ponto de partida de extrapolações para doses mais baixas.

24. O intervalo entre as doses depende das características do produto químico em estudo e não pode ser prescrito neste método. Contudo, a utilização de intervalos definidos por um fator de 2 a 4 entre doses consecutivas dá frequentemente bons resultados nestes ensaios, sendo muitas vezes melhor ensaiar um quarto grupo do que recorrer a intervalos muito grandes (por exemplo, mais do que um fator de 6 a 10) entre as dosagens. Em geral, são de evitar fatores superiores a 10. Caso contrário, é necessário justificá-los.

25. Conforme se explica mais em pormenor no documento de orientações n.º 116 (6), entre os aspetos a ter em conta na escolha das doses contam-se os seguintes:

— relações não lineares ou pontos de inflexão conhecidos ou de que se suspeite na curva dose-resposta,

— aspetos toxicocinéticos e doses às quais ocorra, ou não ocorra, indução metabólica, saturação ou não linearidade entre as doses externas e as doses internas,

— lesões precursoras, marcadores de efeitos ou indicadores de processos biológicos fundamentais subjacentes em curso,

— aspetos fundamentais (ou de que se suspeite) do modo de ação, tais como as doses às quais começam a manifestar-se efeitos citotóxicos, os níveis hormonais são perturbados, os mecanismos homeostáticos colapsam, etc.,

— regiões da curva dose-resposta que necessitam de estimativas especialmente rigorosas, por exemplo, perto da dose de referência prevista ou da dose à qual se suspeite corresponder um limiar,

— níveis previstos de exposição humana.

▼M4

26. O grupo de controlo deve ser um grupo não exposto ao produto químico em estudo ou, se for usado um veículo para administrar o produto químico, um grupo de controlo do veículo. Salvo no que respeita à exposição ao produto químico em estudo, os animais do grupo de controlo devem ser tratados do mesmo modo que os animais dos grupos ensaiados. Caso se utilize um veículo, o grupo de controlo deve receber o volume máximo de veículo utilizado nos grupos expostos ao produto químico em estudo. Se o produto químico for administrado por via da dieta e reduzir significativamente a quantidade desta ingerida por lhe conferir menor palatabilidade, um grupo de controlo adicional alimentado do mesmo modo, em paralelo, pode constituir um grupo de controlo mais adaptado.

27. Se, com base em estudos preliminares, for de prever que o ensaio, realizado de acordo com o presente método, de uma dose equivalente a não menos de 1 000 mg/kg de peso corporal/dia não provoque efeitos adversos e, tendo em conta dados referentes a produtos químicos estruturalmente afins, não forem de prever efeitos tóxicos, pode considerar-se que não é necessário efetuar um estudo completo com três doses. Nesses casos, pode justificar-se um limite de 1 000 mg/kg de peso corporal/dia, exceto se os dados relativos à exposição humana aconselharem o ensaio de doses superiores.

Preparação das doses e administração do produto químico em estudo

28. O produto químico em estudo é normalmente administrado por via oral, através da dieta ou da água de beber ou por intermédio de uma sonda esofágica. O documento de orientações n.º 116 (6) contém mais informações sobre vias e métodos de administração. A via e o método de administração dependem do objetivo do estudo, bem como das propriedades físico-químicas e biodisponibilidade do produto químico em causa e da via e do método de exposição humana predominantes. É necessário fundamentar a via e o método de administração escolhidos. Por razões de bem-estar animal, normalmente só deve optar-se pela utilização de uma sonda esofágica no caso dos agentes relativamente aos quais a via oral e este método de administração representem razoavelmente a exposição humana potencial (por exemplo, através da ingestão de produtos farmacêuticos). No caso dos produtos químicos ingeridos com os alimentos ou disseminados no ambiente, nomeadamente pesticidas, a administração habitual é por incorporação na dieta ou na água de beber. Todavia, para outros cenários — caso da exposição profissional —, pode justificar-se a administração por outras vias.

29. Se necessário, pode suspender-se ou dissolver-se o produto químico em estudo num veículo apropriado. Devem ser tidos em conta as seguintes características que se justifiquem do veículo e de outros aditivos: efeitos na absorção, na distribuição, no metabolismo ou na retenção do produto químico em estudo, efeitos nas propriedades químicas do produto químico em causa suscetíveis de alterarem as características tóxicas do mesmo e efeitos no consumo de alimentos, na ingestão de água ou no estado nutricional dos animais. Recomenda-se que, sempre que possível, a primeira opção seja uma solução ou suspensão aquosa; caso tal não seja viável, pode optar-se por uma solução ou emulsão num óleo (por exemplo, em óleo de milho); em último caso, poderá recorrer-se a uma solução noutro veículo. Se o veículo utilizado não for água, é necessário conhecer as suas características de toxicidade. Deve dispor-se de informações sobre a estabilidade do produto químico em estudo e a homogeneidade das soluções ou rações de dosagem (consoante o caso) nas condições de administração (por exemplo, por via da dieta).

30. É importante assegurar que a quantidade de um produto químico em estudo administrada através da dieta ou da água de beber não interfere nas exigências normais de nutrição nem no equilíbrio hídrico. No caso dos estudos de toxicidade a longo prazo nos quais o produto químico seja administrado pela via alimentar, a concentração deste nos alimentos não deve, normalmente, exceder 5 % da ração total, a fim de evitar desequilíbrios nutricionais. Se o produto químico em estudo for administrado por via da dieta, pode optar-se por concentrações constantes nesta (mg/kg de alimentos ou ppm) ou por doses constantes em relação ao peso corporal do animal (mg/kg de peso corporal), calculadas semanalmente. Deve indicar-se a opção tomada.

▼M4

31. Em caso de administração por via oral, os animais recebem uma dose quotidiana (sete dias por semana) do produto químico em estudo, normalmente durante doze meses (ver também o ponto 33), embora possa ser necessário um período mais longo, em função das exigências da regulamentação. É necessário justificar qualquer outro regime de dosagem (por exemplo, cinco dias por semana). Em caso de administração por via dérmica, os animais são normalmente expostos ao produto químico em estudo durante, pelo menos, seis horas por dia, sete dias por semana, conforme se descreve no capítulo B.9 (10) deste anexo, ao longo de doze meses. A exposição por via inalatória é efetuada durante seis horas por dia, sete dias por semana. Todavia, caso se justifique, também podem expor-se os animais durante cinco dias por semana. O período de exposição neste caso é normalmente de doze meses. Se espécies que não o rato forem sujeitas a exposição unicamente nasal, pode ajustar-se a duração máxima da exposição para minimizar a tensão gerada na espécie em causa. Se a duração da exposição for inferior a seis horas por dia, é necessário fundamentá-lo. Ver também o capítulo B.8 (8) deste anexo.

32. A administração do produto químico aos animais por meio de uma sonda esofágica deve efetuar-se à mesma hora do dia por meio de um tubo estomacal ou de uma cânula de intubação adequada. Normalmente, administra-se a dose diária de uma só vez. Porém, se o produto químico for, por exemplo, um irritante local, pode repartir-se a mesma dose diária por dois momentos. O volume máximo de líquido que pode ser administrado de cada vez depende do tamanho do animal e deve ser o mínimo possível. No caso dos roedores, normalmente não deve exceder 1 ml/100 g de peso corporal (22). Para minimizar diferenças entre volumes administrados, devem ser efetuados ajustes nas concentrações, de forma que o volume seja o mesmo para todas as doses. Excetuam-se os produtos químicos potencialmente corrosivos ou irritantes, que têm de ser diluídos para evitar efeitos locais intensos. Devem evitar-se concentrações que possam provocar efeitos corrosivos ou irritantes no tubo digestivo.

Duração do estudo

33. Embora este método tenha sido preferencialmente concebido para estudos de toxicidade crónica com a duração de doze meses, também está adaptado e pode aplicar-se a estudos mais curtos (por exemplo, 6 ou 9 meses) ou mais longos (por exemplo, 18 ou 24 meses), consoante o exija a regulamentação pertinente ou por razões mecanísticas determinadas. Se o período de exposição não for de doze meses, é necessário fundamentá-lo, sobretudo se a duração da exposição for mais curta. Os grupos satélites incluídos para verificar a reversibilidade de alterações toxicológicas induzidas pelo produto químico em estudo devem manter-se sem dosagem após o termo da exposição, durante um período não inferior a quatro semanas e não superior a um terço da duração total do estudo. O documento de orientações n.º 116 (6) contém mais orientações, nomeadamente em matéria de sobrevivência dos animais no estudo.

EXAMES

34. Normalmente no início e no final de cada dia, incluindo fins de semana e feriados, devem verificar-se os casos de morbidez ou mortalidade no conjunto dos animais. Pelo menos uma vez por dia, deve efetuar-se um exame clínico geral, de preferência sempre à(s) mesma(s) hora(s) e, no caso da administração por sonda esofágica, tendo em conta o período previsto de efeitos mais acentuados após a administração do produto químico.

▼M4

35. Deve efetuar-se um exame clínico aprofundado a cada animal pelo menos uma vez antes da primeira exposição (para poder fazer depois comparações com o estado inicial do animal), no final da primeira semana do estudo e, a partir daí, mensalmente. Os exames devem respeitar um protocolo que minimize as variações entre quem os realiza e não faça depender os resultados do grupo examinado. Estes exames devem ser realizados fora das gaiolas, de preferência num recinto normalizado e sempre à mesma hora. Os resultados destes exames devem ser cuidadosamente registados, de preferência por recurso a um sistema de pontuação claramente definido pelo laboratório em causa. Deve zelar-se por que as condições de exame sejam o mais constantes possível. Entre os sinais a registar contam-se alterações da pele, da pelagem, dos olhos e das mucosas e a ocorrência de secreções, excreções ou reações neurovegetativas (por exemplo, lacrimação, horripilação, alterações da dimensão pupilar ou respiração anormal). Deve também registar-se qualquer alteração da maneira de o animal se mover, da postura e da reação à manipulação, bem como a ocorrência de movimentos clónicos ou tónicos e de comportamentos estereotipados (por exemplo, atos de higiene repetitivos ou movimentação repetitiva em círculo) ou estranhos (automutilação, movimentação para trás, etc.) (24).

36. Recorrendo a um oftalmoscópio ou a dispositivo equivalente, efetua-se um exame oftalmológico a cada animal antes da primeira administração do produto químico em estudo. No termo do estudo, deve efetuar-se este exame de preferência a todos os animais, mas pelo menos aos dos grupos expostos à dose mais elevada e dos grupos de controlo. Se forem detetadas alterações oculares atribuíveis à exposição ao produto químico em estudo, devem examinar-se todos os animais. Se a análise estrutural ou outros elementos indiciarem efeitos tóxicos ao nível ocular, deve aumentar-se a frequência dos exames oculares.

37. No caso dos produtos químicos que tenham revelado potencial de indução de efeitos neurotóxicos em estudos anteriores de toxicidade por dose repetida a 28 dias e/ou a 90 dias, poderá, a título facultativo, verificar-se a reatividade sensorial a diversos tipos de estímulos (24) — por exemplo, estímulos auditivos, visuais ou propriocetivos (25)(26)(27) — e avaliar-se a força de preensão (28) e a atividade motora (29), antes de iniciar o estudo e, a partir daí, de três em três meses, até aos doze meses, inclusive, bem como no termo do estudo (se for além de doze meses). As referências indicadas contêm mais informações sobre a maneira de proceder em cada caso, embora possam adotar-se procedimentos distintos dos nelas descritos.

38. No caso dos produtos químicos que tenham revelado potencial de indução de efeitos imunotóxicos em estudos anteriores de toxicidade por dose repetida a 28 dias e/ou a 90 dias, poderá, a título facultativo, aprofundar-se a investigação deste parâmetro no termo do estudo.

Peso corporal, consumo de alimentos e de água, eficiência alimentar

39. Todos os animais devem ser pesados no início da exposição, pelo menos uma vez por semana nas primeiras treze semanas e, a partir daí, pelo menos uma vez por mês. Deve medir-se o consumo de alimentos e a eficiência alimentar pelo menos uma vez por semana nas primeiras treze semanas e, a partir daí, pelo menos uma vez por mês. Se o produto químico em estudo for administrado através da água de beber, deve medir-se o consumo de água pelo menos uma vez por semana nas primeiras treze semanas e, a partir daí, pelo menos uma vez por mês. Pode ser útil medir o consumo de água também no caso dos estudos em que se verifiquem alterações do comportamento dos animais a esse nível.

▼M4

Análises hematológicas e de bioquímica clínica

40. Nos estudos com roedores, devem ser efetuadas análises hematológicas a, pelo menos, dez machos e dez fêmeas de cada grupo, aos três, seis e 12 meses e no termo do estudo (se for além de 12 meses), sempre aos mesmos animais. No caso dos ratinhos, a realização das análises hematológicas necessárias pode exigir o recurso a animais satélites (ver o ponto 18). No caso dos estudos em que não sejam utilizados roedores, colhem-se amostras num número mais reduzido de animais (por exemplo, se a espécie utilizada for o cão, quatro animais de cada sexo, por grupo) em estádios intermédios e no termo do estudo, tal como se indicou para os roedores. Se, num estudo anterior, a 90 dias, efetuado com doses comparáveis, não se tiverem detetado alterações dos parâmetros hematológicos, não é necessário efetuar as análises previstas ao fim de três meses, tanto no caso dos roedores como de outras espécies. As amostras de sangue devem ser colhidas, sob anestesia, num ponto determinado a indicar, por exemplo, por punção cardíaca ou no seio retro-orbital.

41. Devem ser efetuadas as seguintes análises (30): contagem total de leucócitos, fórmula leucocitária, contagem de eritrócitos, contagem de plaquetas, concentração de hemoglobina, hematócrito (volume celular sanguíneo após centrifugação), volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média, concentração de hemoglobina corpuscular média, tempo de protrombina e tempo de tromboplastina parcial ativada. Se necessário, em função da toxicidade do produto químico em estudo, poderão analisar-se outros parâmetros hematológicos, tais como os corpos de Heinz e outras anomalias morfológicas dos eritrócitos ou a meta-hemoglobina. Em termos gerais, deve adotar-se uma perspetiva de flexibilidade, dependendo dos efeitos observados e/ou previstos do produto químico em causa. Se este tiver efeitos no sistema hematopoiético, pode ser útil efetuar também a contagem de reticulócitos e uma citologia da medula óssea, embora estas análises não sejam sistematicamente necessárias.

42. Com a cronologia especificada para as análises hematológicas e colhendo as amostras de sangue sempre nos mesmos animais — pelo menos dez machos e dez fêmeas de cada grupo —, devem ser efetuadas análises de bioquímica clínica para determinar os principais efeitos tóxicos nos tecidos, nomeadamente ao nível dos rins e do fígado. No caso dos ratinhos, a realização das necessárias análises de bioquímica clínica pode exigir o recurso a animais satélites. No caso dos estudos em que não sejam utilizados roedores, colhem-se amostras num número mais reduzido de animais (por exemplo, se a espécie utilizada for o cão, quatro animais de cada sexo, por grupo) em estádios intermédios e no termo do estudo, tal como se indicou para os roedores. Se, num estudo anterior, a 90 dias, efetuado com doses comparáveis, não se tiverem detetado alterações dos parâmetros de bioquímica clínica, não é necessário efetuar as análises previstas ao fim de três meses, tanto no caso dos roedores como de outras espécies. Recomenda-se o jejum dos animais (exceto dos ratinhos) durante a noite, antes da colheita das amostras de sangue. Devem ser efetuadas as seguintes análises (30): glucose, ureia (azoto ureico), creatinina, proteínas totais, albumina, cálcio, sódio, potássio, colesterol total, pelo menos duas análises reveladoras de efeitos hepatocelulares (alanina-aminotransferase, aspartato-aminotransferase, glutamato-desidrogenase, ácidos biliares totais) (31) e, pelo menos, duas análises reveladoras de efeitos hepatobiliares (fosfatase alcalina, gama-glutamil-transferase, 5'-nucleotidase, bilirrubina total, ácidos biliares totais) (31). Se necessário, em função da toxicidade do produto químico em estudo, poderão analisar-se outros parâmetros de química clínica, tais como a colinesterase, hormonas específicas e os triglicéridos em jejum. Em termos gerais, deve adotar-se uma perspetiva de flexibilidade, dependendo dos efeitos observados e/ou previstos do produto químico em causa.

▼M4

43. Devem ser efetuadas análises de urina a, pelo menos, dez machos e dez fêmeas de cada grupo, em amostras colhidas com a cronologia especificada para as análises hematológicas e de química clínica. Se, num estudo anterior, a 90 dias, efetuado com doses comparáveis, não se tiverem detetado alterações dos parâmetros analisados na urina, não é necessário efetuar as análises previstas ao fim de três meses. Uma recomendação de peritos relativa a estudos de patologia clínica (30) inclui a seguinte lista de parâmetros: aspeto, volume, osmolalidade ou densidade, pH, proteínas totais e glucose. Podem também determinar-se os seguintes parâmetros: corpos cetónicos, urobilinogénio, bilirrubina e sangue oculto. Pode ser necessário recorrer ainda a outros parâmetros para investigar melhor os efeitos observados.

44. Em geral, considera-se que, nos estudos em cães, é necessário dispor dos valores de base dos parâmetros hematológicos e de bioquímica clínica antes de iniciar a exposição dos animais, o mesmo não sucedendo, porém, no caso dos estudos em roedores (30). Se os dados de base históricos (ver o ponto 50) forem inadequados, pode, no entanto, ser necessário determinar os dados em falta.

Patologia

Autópsia macroscópica

45. Normalmente, deve ser realizada a todos os animais estudados uma autópsia macroscópica completa e pormenorizada através do exame cuidadoso da superfície exterior do corpo, dos orifícios, das cavidades craniana, torácica e abdominal e do conteúdo de cada uma destas. Todavia, pode igualmente prever-se que (no caso dos grupos com destino a eutanásia intercalar e dos grupos satélites) as determinações se limitem a parâmetros fundamentais específicos, por exemplo, de neurotoxicidade ou de imunotoxicidade (ver o ponto 19). Não é necessário autopsiar esses animais nem aplicar-lhes os procedimentos descritos nos pontos seguintes. Fica ao critério do diretor do estudo decidir em que casos é necessário autopsiar animais sentinelas.

46. Deve determinar-se o peso dos órgãos de cada animal, com exceção dos excluídos no ponto 45. Removem-se convenientemente todos os tecidos aderentes às glândulas suprarrenais, ao encéfalo, aos epidídimos, ao coração, aos rins, ao fígado, aos ovários, ao baço, aos testículos, à tiroide (com as glândulas paratiroides, sendo a pesagem efetuada depois da fixação) e ao útero de todos os animais (exceto os moribundos e os que sejam eutanasiados durante o estudo) e pesa-se cada um destes ainda húmido o mais rapidamente possível depois da dissecação, para evitar que seque. Nos estudos em ratinhos, a pesagem das glândulas suprarrenais é facultativa.

47. Os tecidos a seguir indicados devem conservar-se no meio de fixação mais adequado ao tipo de tecido em causa e ao exame histopatológico previsto (32) — os tecidos entre parênteses retos são facultativos:

todas as lesões macroscópicas	coração	pâncreas	estômago (pré-estômago, estômago glandular)
glândulas suprarrenais	íleo	glândulas paratiroides	[dentes]
aorta	jejuno	nervo periférico	testículos
encéfalo (incluindo secções dos hemisférios cerebrais, do cerebelo e da medula/protuberância anelar)	rins	hipófise	timo
cego	glândulas lacrimais (exo-orbitais)	próstata	tiroide
colo do útero	fígado	reto	[língua]

▼M4

glândulas de coagulação	pulmões	glândulas salivares	traqueia
cólon	gânglios linfáticos (superficiais e profundos)	vesículas seminais	bexiga urinária
duodeno	glândulas mamárias (obrigatório no caso das fêmeas e, nos machos, se for claramente dissecável)	músculo esquelético	útero, incluindo o colo do útero
epidídimo	[vias respiratórias superiores, incluindo o nariz, os cornetos e os seios paranasais]	pele	[ureteres]
olhos (incluindo a retina)	esófago	medula espinal (a três níveis: cervical, mediotorácico e lombar)	[uretra]
[fémur com articulação]	[bolbo olfativo]	baço	vagina
vesícula biliar (exceto no caso do rato)	ovários	[esterno]	secção da medula óssea e/ /ou uma punção recente de medula óssea
glândulas de Harder			

No caso dos órgãos emparelhados (por exemplo, os rins e as glândulas suprarrenais), devem ser conservados ambos. Os resultados clínicos e outros podem aconselhar o exame de outros tecidos. Devem ser conservados também todos os órgãos que as propriedades conhecidas do produto químico em estudo indiciem que serão provavelmente afetados. Nos estudos por via dérmica, os órgãos a conservar são ainda os constantes da lista relativa à exposição por via oral, mas é essencial proceder igualmente à amostragem e à conservação de pele do local onde o produto químico em estudo foi aplicado. Nos estudos por inalação, a lista de tecidos do aparelho respiratório a conservar e a examinar deve seguir as recomendações dos capítulos B.8 (8) e B.29 (9) deste anexo. A lista de outros órgãos e tecidos a examinar neste caso (além dos tecidos do aparelho respiratório a conservar já especificados), é a estabelecida para a exposição por via oral.

Histopatologia

48. A referência 32 contém orientações sobre as melhores práticas a seguir na realização de estudos de patologias toxicológicas. Os exames histopatológicos devem incidir, no mínimo, no seguinte:

— todos os tecidos dos animais dos grupos de controlo e dos grupos expostos à dose mais elevada,

— todos os tecidos dos animais que morreram ou foram eutanasiados durante o estudo,

— todos os tecidos com anomalias macroscópicas,

— os tecidos dos órgãos-alvo, e os tecidos que revelaram alterações atribuíveis à exposição ao produto químico em estudo nos animais dos grupos expostos à dose mais elevada, de todos os animais de todos os outros grupos expostos a uma dose do produto químico,

— no caso dos órgãos emparelhados (por exemplo, os rins e as glândulas suprarrenais), devem examinar-se ambos.

▼M4

DADOS E RELATÓRIOS

Dados

49. Devem ser apresentados dados por animal relativos a todos os parâmetros avaliados. Esses dados devem ainda ser resumidos num quadro, indicando, para cada grupo estudado, o número de animais no início do ensaio, o número de animais que morreram durante o ensaio ou que foram eutanasiados, a hora de cada morte ou eutanásia, o número de animais que apresentaram sinais de toxicidade, a descrição dos sinais de toxicidade observados, nomeadamente o momento do seu aparecimento e a sua duração e intensidade, o número de animais que apresentaram lesões, o tipo de lesões e a percentagem de animais que apresentaram cada tipo de lesão. Devem constar dos quadros de resumo dos dados as médias e os desvios-padrão (no caso dos dados contínuos) correspondentes aos animais que apresentaram lesões ou efeitos tóxicos, além do grau das lesões.

50. Os dados históricos de controlo podem ser úteis para a interpretação dos resultados do estudo, por exemplo, quando houver indicações de que os dados provenientes dos grupos de controlo em paralelo divergem significativamente de dados recentes referentes a animais de controlo da mesma colónia e da mesma unidade de ensaio. Caso sejam avaliados dados históricos de controlo, estes devem provir do mesmo laboratório, reportar-se a animais da mesma idade e estirpe e ter sido gerados nos cinco anos anteriores ao estudo em causa.

51. Quando pertinente, devem ser avaliados os resultados numéricos por um método estatístico corrente adequado. Os métodos estatísticos e os dados a analisar devem ser escolhidos no planeamento do estudo (ponto 8). Nessa escolha, devem ser previstos os ajustamentos em função do grau de sobrevivência que se revelem necessários.

Relatório dos ensaios

52. Dados a constar do relatório dos ensaios:

Produto químico em estudo:

— natureza física, grau de pureza e propriedades físico-químicas,

— dados de identificação,

— proveniência,

— número de lote,

— boletim de análises químicas.

Veículo (se for o caso):

— justificação da escolha do veículo (se não for água).

Animais estudados:

— espécie e estirpe utilizadas e justificação da opção tomada,

— número, idade e sexo dos animais no início dos ensaios,

▼M4

— proveniência, condições de alojamento, dieta, etc.,

— peso de cada animal no início do ensaio.

Condições de realização dos ensaios:

— fundamentação da via de administração e das doses escolhidas,

— métodos estatísticos utilizados na análise dos dados, se for o caso,

— elementos relativos à formulação do produto químico em estudo/à incorporação do mesmo na dieta fornecida aos animais,

— dados analíticos relativos à concentração atingida, estabilidade e homogeneidade da preparação,

— via de administração e elementos relativos à administração do produto químico em estudo,

— no caso dos estudos por inalação: exposição unicamente nasal ou de corpo inteiro,

— doses reais (mg/kg de peso corporal/dia) e, se for caso disso, fator de conversão entre a concentração do produto químico em estudo na dieta ou na água de beber (mg/kg ou ppm) e a dose real,

— elementos sobre a qualidade dos alimentos e da água.

Resultados (apresentar quadros de resumo dos dados e os dados por animal):

— dados de sobrevivência,

— pesos corporais e alterações de peso corporal,

— consumo de alimentos, cálculos da eficiência alimentar (se efetuados) e consumo de água (se for caso disso),

— dados das respostas tóxicas em função do sexo e da dose administrada, incluindo os sinais de toxicidade,

— natureza, incidência (e, se quantificada, intensidade) e duração dos sinais clínicos observados (transitórios ou permanentes),

— exame oftalmológico,

— análises hematológicas,

— análises de bioquímica clínica,

— análises de urina,

— resultados dos estudos de neurotoxicidade ou de imunotoxicidade eventualmente efetuados,

— peso corporal terminal,

— peso de cada órgão (e relação com o peso corporal, se for caso disso),

— resultados das autópsias,

— descrição pormenorizada dos resultados histopatológicos resultantes da exposição dos animais ao produto químico em estudo,

— dados de absorção, se disponíveis.

▼**M4**

Tratamento estatístico dos resultados, se for caso disso.

Discussão dos resultados, nomeadamente:

— relações dose-resposta,

— análise dos dados disponíveis sobre modos de ação,

— discussão dos eventuais modelos,

— determinação das doses de referência, do NOAEL e do LOAEL,

— dados históricos de controlo,

— importância para o ser humano.

Conclusões:

REFERÊNCIAS:

(1) OCDE (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Roma, 1995). Documento de trabalho interno. Environment Directorate, OCDE, Paris.

(2) Combes R.D., Gaunt I., Balls M. (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. *ATLA* 32:163-208.

(3) Barlow S.M., Greig J.B., Bridges J.W. *et al.* (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. *Food. Chem. Toxicol.* 40:145-191.

(4) Chhabra R.S., Bucher J.R., Wolfe M., Portier C. (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 206:437-445.

(5) Capítulo B.27 deste anexo, "Ensaio de toxicidade oral subcrónica — Estudo de toxicidade oral de dose repetida em espécies não roedoras com a duração de 90 dias".

(6) OCDE (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 – segunda edição. Series on Testing and Assessment No. 116. Disponível no sítio Web público de *Test Guidelines* da OCDE (www.oecd.org/env/testguidelines).

(7) OCDE (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Series on Testing and Assessment No. 39. ENV/JM/MONO(2009)28, OCDE, Paris.

(8) Capítulo B.8 deste anexo, "Toxicidade subaguda por inalação: estudo de 28 dias".

(9) Capítulo B.29 deste anexo, "Toxicidade subcrónica por inalação: Estudo de 90 dias".

(10) Capítulo B.9 deste anexo, "Toxicidade (dérmica) da dose repetida (28 dias)".

(11) Carmichael N.G., Barton H.A., Boobis A.R. *et al.* (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. *Critical Reviews in Toxicology* 36:1-7.

(12) Barton H.A., Pastoor T.P., Baetcke T. *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. *Critical Reviews in Toxicology* 36:9-35.

(13) Doe J.E., Boobis A.R., Blacker A. *et al.* (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. *Critical Reviews in Toxicology* 36:37-68.

▼M4

(14) Cooper R.L., Lamb J.S., Barlow S.M. *et al.* (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. *Critical Reviews in Toxicology* 36:69-98.

(15) OCDE (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies. Series on Testing and Assessment No. 35; Series on Pesticides No. 14. ENV/JM/MONO(2002)19, OCDE, Paris.

(16) OCDE (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, No. 19. ENV/JM/MONO(2000)7, OCDE, Paris.

(17) Rhomberg L.R., Baetcke K., Blancato J., Bus J., Cohen S., Conolly R., Dixit R., Doe J., Ekelman K., Fenner-Crisp P., Harvey P., Hattis D., Jacobs A., Jacobson-Kram D., Lewandowski T., Liteplo R., Pelkonen O., Rice J., Somers D., Turturro A., West W., Olin S. (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection. *Critical Reviews in Toxicology* 37(9):729 - 837.

(18) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.

(19) Diretiva 2010/63/UE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 22 de setembro de 2010, relativa à proteção dos animais utilizados para fins científicos (JO L 276 de 20.10.2010, p. 33).

(20) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington D.C., US. Dept. of Health and Human Services.

(21) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255--04-2.

(22) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

(23) Diehl K.-H., Hull R., Morton D., Pfister R., Rabemampianina Y., Smith D., Vidal J.-M., van de Vorstenbosch C. (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *Journal of Applied Toxicology* 21:15-23.

(24) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.

(25) Tupper D.E., Wallace R.B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. *Acta Neurobiol. Exp.* 40:999-1 003.

(26) Gad S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. *J. Toxicol. Environ. Health* 9:691-704.

(27) Moser V.C., McDaniel K.M., Phillips P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 108:267-283.

(28) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C., Riley M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice. *Neurobehav. Toxicol.* 1:233-236.

(29) Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. *Neurotoxicol. Teratol.* 13:599-609.

▼**M4**

(30) Weingand K., Brown G., Hall R. *et al.* (1996). Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. *Fundam. & Appl. Toxicol.* 29:198-201.

(31) Documento da EMEA (*draft*) "Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity" (Ref.[a] EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).

(32) Crissman J.W., Goodman D.G., Hildebrandt P.K. *et al.* (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. *Toxicologic Pathology* 32:126-131.

▼**M4**

Apêndice 1

DEFINIÇÃO

Produto químico em estudo: qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado este método de ensaio.

▼B

B.31. ESTUDO DE TOXICIDADE SOBRE O DESENVOLVIMENTO PRÉ-NATAL

1. MÉTODO

O presente método baseia-se na publicação OECD TG 414 (2001) (normas de ensaio da OCDE).

1.1. INTRODUÇÃO

O presente método de ensaio de toxicidade sobre o desenvolvimento destina-se a fornecer informação geral sobre os efeitos de exposição pré-natal no animal de ensaio prenhe e no organismo em desenvolvimento no útero; pode incluir a avaliação de efeitos maternos e de morte, anomalias estruturais ou alterações no crescimento do feto. Apesar de constituírem uma parte importante do desenvolvimento, as deficiências funcionais não são contempladas neste método de ensaio, poderão ser testadas num estudo independente ou em complementaridade ao presente estudo, usando o método de ensaio de neurotoxicidade sobre o desenvolvimento. Para obter informações relativas aos ensaios sobre deficiências funcionais e outros efeitos pós-natais, deverão consultar-se os métodos de ensaio para o estudo da toxicidade sobre a reprodução em duas gerações e o estudo da neurotoxicidade sobre o desenvolvimento, conforme seja apropriado.

Em situações pontuais, poderá revelar-se oportuno introduzir adaptações específicas no método de ensaio com base em informações relativas, por exemplo, às propriedades físico-químicas ou toxicológicas da substância de ensaio. Contudo, este procedimento só será aceitável quando existirem fortes razões científicas de que as alterações ao método conduzirão a um ensaio mais informativo. Nesse caso, os fundamentos científicos que justificam as adaptações introduzidas deverão ser cuidadosamente documentados no relatório do estudo.

1.2. DEFINIÇÕES

Toxicologia sobre o desenvolvimento: estudo dos efeitos adversos que se manifestam num organismo em desenvolvimento em resultado da exposição a determinada substância antes da concepção, durante o desenvolvimento pré-natal ou no período que decorre desde o nascimento até à maturação sexual. As principais manifestações de toxicidade sobre desenvolvimento incluem: 1) morte do organismo, 2) anomalia estrutural, 3) alterações no crescimento e 4) deficiência funcional. Anteriormente, a toxicologia sobre o desenvolvimento era, em muitos casos, designada por teratologia.

Efeito adverso: qualquer alteração à normalidade relacionada com o tratamento que diminua a capacidade de um organismo para sobreviver, reproduzir-se ou adaptar-se ao meio ambiente. No que respeita à toxicologia sobre o desenvolvimento, esta definição abrange, no seu sentido mais lato, todos os efeitos que interfiram no desenvolvimento normal do concepto, antes e após o nascimento.

Alterações no crescimento: alteração de peso ou tamanho do corpo ou de um órgão de um descendente.

Alterações (anomalias): alterações estruturais no desenvolvimento, que incluem as malformações e as variações (28).

Malformação/Anomalia grave: alteração estrutural considerada prejudicial para o animal (pode também ser letal), cuja ocorrência é normalmente rara.

▼B

Variação/Anomalia ligeira: alteração estrutural pouco ou nada prejudicial para o animal; pode ser transiente e ocorrer com relativa frequência na população de controlo.

Concepto: conjunto dos derivados de um óvulo fertilizado em qualquer estádio de desenvolvimento, desde a fertilização até ao nascimento, incluindo as membranas extraembrionárias, bem como o embrião ou o feto.

Implantação (nidação): ligação do blastocisto ao revestimento epitelial do útero, incluindo a sua penetração através do epitélio uterino e a sua implantação no endométrio.

Embrião: estádio inicial ou em desenvolvimento de qualquer organismo; mais especificamente, é o produto da fertilização de um óvulo nas fases de desenvolvimento que decorrem desde o aparecimento da corda dorsal até à formação de todas as estruturas principais.

Embriotoxicidade: conjunto dos efeitos prejudiciais sobre a estrutura, desenvolvimento, crescimento e/ou viabilidade normais de um embrião.

Feto: organismo em gestação no período pós-embrionário.

Toxicidade fetal: conjunto dos efeitos prejudiciais sobre a estrutura, desenvolvimento, crescimento e/ou viabilidade normais de um feto.

Aborto: expulsão prematura do útero dos produtos da concepção: o embrião ou um feto inviável.

Reabsorção: reabsorção (presente ou passada) de um produto de concepção morto depois de implantado no útero.

Reabsorção prematura: sinais de implantação sem existência reconhecível de embrião/feto.

Reabsorção tardia: embrião ou feto morto, que apresentam alterações degenerativas externas.

NSEAO: abreviatura para nível sem efeito adverso observável; corresponde à maior dose ou ao maior nível de exposição para o qual não se observam efeitos adversos relacionados com o tratamento.

1.3. SUBSTÂNCIA DE REFERÊNCIA

Nenhuma.

1.4. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

Normalmente, a substância de ensaio é administrada aos animais prenhes desde o momento da implantação (pelo menos) até ao dia anterior ao previsto para o sacrifício. O dia do sacrifício deverá ser agendado o mais próximo possível da data esperada para o parto, sem que seja descurada a possibilidade de ocorrerem parto prematuro e a consequente perda de dados. O método de ensaio não se destina apenas a examinar o período da organogénese (por exemplo, dias 5-15 em roedores e dias 6-18 no coelho); permite também avaliar efeitos de toxicidade desde a pré-implantação (se apropriado) e ao longo de todo o período de gestação até ao dia anterior à operação cesariana. As fêmeas são sacrificadas pouco antes da operação cesariana, após o que os conteúdos uterinos são examinados e os fetos inspeccionados para detectar a presença de anomalias externas visíveis e alterações dos tecidos moles e do esqueleto.

▼B

1.5. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.5.1. **Selecção de espécies animais**

Recomenda-se que o ensaio seja realizado com as espécies mais relevantes e que se utilizem as espécies e estirpes laboratoriais mais vulgarmente usadas em ensaios de toxicidade sobre o desenvolvimento pré-natal. As espécies preferidas para ensaio são o rato, no caso de roedores, e o coelho, no caso de não roedores. O uso de outras espécies deverá ser devidamente justificado.

1.5.2. **Condições de alojamento e alimentação**

A temperatura do compartimento experimental dos animais deve ser 22 °C (+ 3 °C) para roedores e 18 °C (± 3 °C) para coelhos. A humidade relativa deverá ser 50 %-60 %, embora sejam aceitáveis valores entre um mínimo de 30 % e um máximo que, preferivelmente, não deverá exceder 70 %, salvo durante os períodos de limpeza do compartimento. A iluminação deve ser artificial, com sequências de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão. A alimentação pode basear-se em dietas de laboratório convencionais, com fornecimento ilimitado de água para beber.

O acasalamento deve ocorrer em gaiolas adequadas para o efeito. Embora seja preferível alojar individualmente os animais durante o acasalamento, considera-se aceitável o alojamento conjunto de um pequeno número de animais.

1.5.3. **Preparação dos animais**

Devem usar-se animais saudáveis que tenham permanecido nas condições laboratoriais durante pelo menos cinco dias antes do ensaio para aclimatação e que não tenham sido sujeitos a experiências anteriores. Os animais de ensaio devem ser caracterizados no que respeita à espécie, estirpe, proveniência, sexo, peso e/ou idade. Os animais de todos os grupos de ensaio devem ser, tanto quanto possível, uniformes quanto ao peso e à idade. Devem usar-se fêmeas jovens, adultas e nulíparas em todos os níveis de dose. As fêmeas devem acasalar com machos da mesma espécie e estirpe, devendo evitar-se o acasalamento entre irmãos. Em roedores, considera-se o dia 0 de gestação aquele em que se observa um rolhão vaginal e/ou esperma. Em coelhos, o dia 0 é normalmente o dia do coito ou da inseminação artificial, caso esta técnica seja usada. As gaiolas devem ser dispostas de forma a minimizar possíveis efeitos derivados do seu posicionamento. Cada animal deve receber um número de identificação individualizado. As fêmeas acasaladas devem ser distribuídas pelos grupos de controlo e de tratamento de forma aleatória. Caso tenha havido alojamento conjunto de várias fêmeas durante o acasalamento, os animais de cada conjunto devem ser distribuídos uniformemente pelos grupos de ensaio. Do mesmo modo, as fêmeas inseminadas pelo mesmo macho devem ser distribuídas equitativamente pelos vários grupos.

1.6. PROCEDIMENTO

1.6.1. **Número e sexo dos animais**

Cada grupo de ensaio e de controlo deve comportar um número de fêmeas suficiente para que se obtenham cerca de 20 animais com locais de implantação no momento da necropsia. Os grupos com menos de 16 animais com locais de implantação poderão ser considerados como inadequados. A mortalidade materna não invalida necessariamente o estudo, desde que não seja superior a cerca de 10 %.

▼B

1.6.2. **Preparação das doses**

Se for usado um agente de transporte ou outro aditivo para facilitar a administração das doses, deverão ser tomadas em consideração as seguintes características: efeitos na absorção, distribuição, metabolismo e retenção ou excreção da substância de ensaio; efeitos nas propriedades químicas da substância de ensaio susceptíveis de alterar as suas características tóxicas; e efeitos no consumo de alimentos, na ingestão de água ou no estado nutricional dos animais. O agente de transporte não deverá apresentar toxicidade sobre o desenvolvimento nem exercer efeitos na reprodução.

1.6.3. **Dosagem**

Normalmente, a substância de ensaio deverá ser administrada diariamente, desde a implantação (por exemplo, no dia cinco pós-acasalamento) até ao dia anterior ao previsto para a operação cesariana. Se estudos anteriores eventualmente disponíveis não indicarem um elevado potencial para perdas pré-implantação, o tratamento poderá prolongar-se de forma a abranger todo o período de gestação, desde o acasalamento até ao dia anterior ao previsto para o sacrifício. É sabido que a manipulação imprópria ou a sujeição a tensões durante a gravidez podem resultar em perdas pré-natais, pelo que devem evitar-se manipulações desnecessárias dos animais prenhes e tensões de origem externa, tais como ruído, de forma a minimizar as perdas por factores não relacionados com o tratamento.

Devem utilizar-se pelo menos três níveis de dose e um controlo simultâneo. Os animais saudáveis devem ser distribuídos aleatoriamente pelos grupos de controlo e de tratamento. Os níveis de dose devem ser espaçados de forma a produzir uma gradação de efeitos tóxicos. A escolha do nível de dose máximo deve ter como objectivo produzir alguma toxicidade sobre o desenvolvimento e/ou sobre a mãe (sinais clínicos ou diminuição do peso corporal), mas não a morte ou sofrimento agudo, salvo se existirem limitações impostas pela natureza físico-química ou pelas propriedades biológicas da substância de ensaio. Pelo menos um dos níveis de dose intermédios deverá produzir efeitos tóxicos mínimos observáveis. O nível de dose mais baixo não deverá induzir qualquer sinal de toxicidade sobre a mãe ou sobre o desenvolvimento. Deve seleccionar-se uma sequência descendente de níveis de dose que permita detectar qualquer resposta relacionada com a dosagem e determinar o nível sem efeito adverso observável (NSEAO). Frequentemente, a melhor forma de estabelecer estas sequências consiste no espaçamento das doses em série geométrica, usando factores de dois ou de quatro. A adição de um quarto grupo de ensaio é muitas vezes preferível ao uso de intervalos muito grandes entre as dosagens (ou seja, com um factor superior a 10). Embora um dos objectivos do ensaio seja a determinação do NSEAO materno, podem considerar-se aceitáveis estudos que não permitam o cálculo deste valor (1).

A escolha dos níveis de dose deverá tomar em consideração todos os dados de toxicidade existentes, bem como informações adicionais sobre o metabolismo e toxicocinética da substância de ensaio ou de substâncias relacionadas. Estas informações poderão ser também usadas para demonstrar a adequação do regime de dosagem.

Deve usar-se um grupo de controlo simultâneo, que poderá ser um grupo com tratamento simulado ou, se for usado um agente de transporte para administrar a substância de ensaio, um grupo de controlo do agente de transporte. Todos os grupos devem ser tratados com o mesmo volume da substância de ensaio ou do agente de transporte. Os animais do(s) grupo(s) de controlo devem ser manipulados de forma idêntica aos animais dos grupos de ensaio. Os grupos de controlo do agente de transporte deverão receber o volume máximo de agente de transporte utilizado no ensaio (ou seja, um volume idêntico ao do grupo do nível de dose mais baixo).

▼B

1.6.4. **Ensaio-limite**

Se um ensaio com um nível de dose oral de pelo menos 1 000 mg/kg de peso corporal/dia, realizado de acordo com os procedimentos descritos neste estudo, não provocar toxicidade observável nos animais prenhes nem na sua descendência e se, para além disso, os dados existentes sobre compostos estrutural e/ou metabolicamente relacionados com a substância de ensaio não sugerirem a possível ocorrência de efeitos, poderá considerar-se desnecessário realizar um ensaio completo com três níveis de dose. Nos casos em que se preveja exposição humana, poderá ser necessário aumentar o nível de dose oral no ensaio-limite. Quando se usam outras formas de administração, como inalação ou aplicação cutânea, as propriedades físico-químicas da substância de ensaio são muitas vezes indicativas e limitantes do nível máximo de exposição praticável (por exemplo, a aplicação cutânea não deverá causar toxicidade local grave).

1.6.5. **Administração das doses**

Na maior parte dos casos, a substância de ensaio ou o agente de transporte são administrados oralmente por intubação. Se for usada outra via de administração, o experimentador deverá indicar e justificar as razões que presidiram à sua escolha; nesse caso, poderá ser necessário introduzir modificações apropriadas no método de ensaio (2)(3)(4). A substância de ensaio deve ser administrada todos os dias aproximadamente à mesma hora.

Normalmente, a dose a administrar a cada animal é calculada com base na determinação mais recente do seu peso corporal. No entanto, o ajuste das doses durante o último terço da gravidez deve ser feito com precaução. A escolha da dose deve tomar em consideração dados de estudos anteriores para evitar um excesso de toxicidade materna; contudo, se tal suceder, as mães com indícios de toxicidade excessiva devem ser sacrificadas. Se vários animais prenhes apresentarem sinais de excesso de toxicidade, deverá considerar-se a possibilidade de pôr termo ao grupo de dose a que pertencem. A administração por gavagem deve ser feita, de preferência, numa toma única, usando uma sonda gástrica ou uma cânula de intubação apropriada. O volume máximo de líquido que pode ser administrado numa toma depende do tamanho do animal de ensaio, não devendo exceder 1 ml/100 g de peso corporal; exceptuam-se as soluções aquosas, que podem ser administradas na proporção de 2 ml/100 g de peso corporal. Quando se usa óleo de milho como agente de transporte, o volume máximo aceitável é de 0,4 ml/100 g de peso corporal. Deve minimizar-se a variabilidade do volume de ensaio efectuando ajustes nas concentrações, de forma a assegurar a constância do volume em todos os níveis de dose.

1.6.6. **Observação das mães**

Devem efectuar-se observações clínicas pelo menos uma vez por dia, de preferência sempre à(s) mesma(s) hora(s). A escolha do momento da observação deve tomar em consideração o período de efeitos máximos previsto que se verifica após a administração da dose. Estas observações devem ser descritas num registo, que deverá conter indicações sobre a condição dos animais, incluindo mortalidade, estado moribundo, alterações pertinentes do comportamento e todos os sinais de manifesta toxicidade.

1.6.7. **Peso corporal e consumo de alimento**

Os animais devem ser pesados no dia 0 de gestação (se os animais acasalados forem fornecidos por um criador externo, a pesagem poderá ser feita até ao dia três de gestação, o mais tardar), no primeiro dia de dosagem, de três em três dias (pelo menos) durante o período de dosagem e no dia do sacrifício.

▼B

Devem efectuar-se registos do consumo de alimento de três em três dias, coincidindo com dias da determinação do peso corporal.

1.6.8. **Inspecção pós-morte**

As fêmeas devem ser sacrificadas no dia anterior ao previsto para o parto. As fêmeas que apresentem sinais de aborto ou parto prematuro antes da data marcada para o sacrifício deverão ser mortas antecipadamente e submetidas a um exame macroscópico completo.

No momento do sacrifício ou da morte durante o estudo, as mães serão objecto de um exame macroscópico, a fim de se detectarem quaisquer anomalias estruturais ou modificações patológicas. A observação das mães durante a operação de cesariana e a subsequente análise fetal deverão ser feitas de preferência sem que os restantes animais do grupo se apercebam para evitar perturbações.

1.6.9. **Exame dos conteúdos uterinos**

Imediatamente após o sacrifício ou o mais cedo possível depois da morte espontânea, os úteros serão retirados para se averiguar o estado de gravidez dos animais. Os úteros que não se apresentem grávidos devem ser submetidos a exames adicionais (por exemplo, coloração com sulfureto de amónio em roedores e coloração de Salewsky ou um método alternativo apropriado em coelhos) para confirmar o estado de não gravidez (5).

Devem pesar-se os úteros grávidos, incluindo o colo. Não serão considerados para pesagem os úteros grávidos provenientes de animais encontrados mortos durante o estudo.

Deve determinar-se o número de corpos amarelos nos animais prenhes.

Devem examinar-se os conteúdos uterinos para determinar os números de embriões ou de fetos mortos, bem como o número de fetos viáveis. Deve avaliar-se o grau de reabsorção, a fim de determinar o tempo relativo da morte do concepto (ver secção 1.2).

1.6.10. **Exame dos fetos**

Devem determinar-se o sexo e o peso corporal de cada feto.

Cada feto será objecto de um exame para detectar alterações externas (6).

Os fetos devem ser examinados para detectar alterações do esqueleto e dos tecidos moles (por exemplo, variações e malformações ou anomalias) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24). É aconselhável (mas não obrigatório) proceder à categorização das alterações fetais, explicitando claramente os critérios usados para definir cada categoria. O aparelho reprodutor deve ser objecto de especial atenção, devendo ser inspeccionado quanto a sinais de alterações no desenvolvimento.

No caso de roedores, devem preparar-se e examinar-se cerca de metade dos animais de cada ninhada para detecção de alterações do esqueleto; os restantes animais serão preparados e examinados para determinar alterações dos tecidos moles, usando métodos aprovados de seccionamento em série ou técnicas adequadas de dissecação macroscópica cuidadosa.

▼B

No caso de não roedores (por exemplo, o coelho), todos os fetos serão examinados para detectar alterações dos tecidos moles e do esqueleto. Os corpos serão preparados por dissecação cuidadosa e examinados quanto à existência de alterações dos tecidos moles; o exame pode incluir procedimentos adicionais para avaliação da estrutura cardíaca interna (25). Metade dos fetos será decapitada e as cabeças removidas serão processadas para avaliação de alterações de tecidos moles (incluindo olhos, cérebro, meatos nasais e língua), usando métodos correntes de seccionamento em série (26) ou outros métodos de sensibilidade idêntica. Os corpos dos fetos decapitados e os restantes fetos intactos serão processados e examinados para se detectarem alterações do esqueleto, recorrendo a métodos idênticos aos descritos para roedores.

2. DADOS

2.1. TRATAMENTO DOS RESULTADOS

Os dados relativos às mães e aos seus descendentes devem ser registados individualmente e resumidos em forma tabular, indicando, para cada grupo de ensaio, o número de animais no início do ensaio, o número de animais encontrados mortos durante o ensaio ou sacrificados por razões humanitárias, o momento de todas as mortes (espontâneas ou provocadas), o número de fêmeas grávidas, o número de animais com sinais de toxicidade, uma descrição dos sinais de toxicidade observados (incluindo o momento do aparecimento, a duração e a intensidade), os tipos de observações embrionárias/fetais e todos os dados relevantes sobre as ninhadas.

Os resultados numéricos devem ser avaliados por um método estatístico apropriado, usando a ninhada como unidade para a análise de dados. Deve usar-se um método estatístico geralmente aceite; a sua escolha deve fazer parte do planeamento do estudo e ser devidamente justificada. Devem também registar-se os dados relativos a animais que não sobreviveram até à data prevista para o sacrifício. Quando apropriado, estes dados poderão ser incluídos nas médias de grupos; contudo, a sua importância e, consequentemente, a sua inclusão ou exclusão em qualquer média de grupo devem ser avaliadas e justificadas caso a caso.

2.2. ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os dados recolhidos no Estudo de Toxicidade sobre o Desenvolvimento Pré-Natal deverão ser analisados em termos dos efeitos observados. Esta análise deverá considerar a seguinte informação:

— resultados do ensaio relativos à mãe e ao embrião/feto, incluindo uma avaliação da relação (ou da ausência de relação) entre a exposição dos animais à substância de ensaio e a incidência e a gravidade de todos os efeitos observados;

— critérios usados para a categorização das alterações externas, dos tecidos moles e do esqueleto dos fetos, caso tenha sido feita;

▼B

— dados de controlo de estudos anteriores, quando apropriado, a fim de consolidar a interpretação dos resultados do presente estudo;

— números usados no cálculo de todas as percentagens ou índices;

— análise estatística adequada dos resultados do estudo, quando apropriado; deverá incluir informação suficiente sobre o método de análise para que um examinador/estatístico independente possa reavaliar e reconstituir a análise.

No caso de o estudo demonstrar a inexistência de qualquer efeito tóxico, deverá considerar-se a possibilidade de realizar investigações adicionais no sentido de definir a absorção e a biodisponibilidade da substância de ensaio.

2.3. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

A finalidade do estudo de toxicidade sobre o desenvolvimento pré-natal reside na obtenção de informações relativas aos efeitos de exposição repetida a uma substância durante a gravidez tanto nas mães como no desenvolvimento intra-uterino dos seus descendentes. A interpretação dos resultados deve tomar em consideração dados de estudos subcrónicos, de reprodução e toxicocinéticos, entre outros eventualmente disponíveis. O estudo enfatiza de igual modo a toxicidade geral, que pode ser avaliada pela toxicidade sobre a mãe, e a toxicidade sobre o desenvolvimento. Assim, os resultados obtidos vão permitir estabelecer, até certo ponto, a distinção entre i) os efeitos sobre o desenvolvimento não associados a toxicidade geral e ii) os efeitos sobre o desenvolvimento que apenas são induzidos em níveis que também são tóxicos para a mãe (27).

3. **RELATÓRIO**

RELATÓRIO DO ENSAIO

O relatório do ensaio deverá incluir as seguintes informações específicas:

Substância de ensaio:

— natureza física e, quando relevante, propriedades físico-químicas;

— identificação, incluindo o número CAS, caso este seja conhecido ou esteja definido;

— pureza.

Agente de transporte (se apropriado):

— caso o agente de transporte não seja água, uma justificação para a sua escolha.

Animais de ensaio:

— espécie e estirpe usadas;

— número e idade dos animais;

— proveniência, condições de alojamento, dieta, etc.;

— pesos individuais dos animais no início do ensaio.

Condições de ensaio:

— razões que presidiram à escolha dos diferentes níveis de dose;

— informação pormenorizada sobre a formulação da substância de ensaio/preparação da dieta, concentração atingida, estabilidade e homogeneidade da preparação;

▼B

— informação pormenorizada sobre a administração da substância de ensaio;

— conversão da concentração da substância de ensaio na dieta/ /água de beber (ppm) para a dose real (mg/kg de peso corporal/ /dia), se aplicável;

— condições ambientais;

— informação pormenorizada sobre a qualidade dos alimentos e da água.

Resultados:

Dados de resposta tóxica materna por dose, incluindo, entre outras informações:

— número de animais no início do ensaio, número de animais sobreviventes, número de animais prenhes, número de animais que abortaram, número de animais com parto prematuro;

— dia da morte no decurso do estudo ou indicação dos animais sobreviventes no termo da experiência;

— os dados relativos a animais que não sobreviveram até à data prevista para o sacrifício devem ser incluídos no relatório, mas não devem ser usados em comparações estatísticas entre grupos;

— dia da observação de cada sinal de anomalia clínica e subsequente evolução dessa anomalia;

— peso corporal, alteração do peso corporal e peso do útero grávido; opcionalmente, alteração do peso corporal corrigida em relação ao peso do útero grávido;

— consumo de alimento e consumo de água (caso este tenha sido medido);

— resultados da necropsia, incluindo o peso uterino;

— deverão indicar-se os valores dos NSEAO para os efeitos maternos e para os efeitos sobre o desenvolvimento.

Desenvolvimento atingido nas ninhadas com implantes em cada nível de dose, incluindo:

— número de corpos amarelos;

— número de implantações, número e percentagem de fetos vivos e mortos e de reabsorções;

— número e percentagem de perdas pré e pós-implantação.

Desenvolvimento atingido nas ninhadas com fetos vivos em cada nível de dose, incluindo:

— número e percentagem de descendentes vivos;

— proporção entre os sexos;

— peso corporal fetal, de preferência por sexo e nos dois sexos em conjunto;

— malformações externas, dos tecidos moles e do esqueleto, bem como outras alterações relevantes;

— critérios usados na categorização, se apropriado;

▼B

— número total e percentagem de fetos e ninhadas que apresentem qualquer alteração externa, dos tecidos moles ou do esqueleto, bem como os tipos e incidências de anomalias individuais e outras alterações relevantes.

Análise dos resultados.

Conclusões.

4. **REFERÊNCIAS**

(1) Kavlock R.J. et al., (1996) A Simulation Study of the Influence of Study Design on the Estimation of Benchmark Doses for Developmental Toxicity. *Risk Analysis* 16, p. 399-410.

(2) Kimmel, C.A. and Francis, E.Z., (1990) Proceedings of the Workshop on the Acceptability and Interpretation of Dermal Developmental Toxicity Studies. *Fundamental and Applied Toxicology*, 14, p. 386-398.

(3) Wong, B.A., et al., (1997) Developing Specialised Inhalation Exposure Systems to Address Toxicological Problems. *CIIT Activities*, 17, p. 1-8.

(4) US Environmental Protection Agency, (1985) Subpart E-Specific Organ/Tissue Toxicity, 40 CFR 798.4350: Inhalation Developmental Toxicity Study.

(5) Salewski, E., (1964) Faerbermethode zum Makroskopischen Nachweis von Implantations Stellen am Uterusder Ratte. *Naunyn-Schmeidebergs Archiv fur Pharmakologie und Experimentelle Pathologie*, 247, 367.

(6) Edwards, J.A., (1968) The external Development of the Rabbit and Rat Embryo. In *Advances in Teratology*. D.H.M. Woolam (ed.) Vol. 3. Academic Press, NY.

(7) Inouye, M. (1976) Differential Staining of Cartilage and Bone in Fetal Mouse Skeleton by Alcian Blue and Alizarin Red S. *Congenital Anomalies* 16, p. 171-173.

(8) Igarashi, E. et al., (1992) Frequency Of Spontaneous Axial Skeletal Variations Detected by the Double Staining Techniquefor Ossified and Cartilaginous Skeleton in Rat Foetuses. *Congenital Anomalies* 32, p. 381-391.

(9) Kimmel, C.A. et al., (1993) Skeletal Development Following Heat Exposure in the Rat. *Teratology* 47, p. 229-242.

(10) Marr, M.C. et al. (1988) Comparison of Single and Double Staining for Evaluation of Skeletal Development: The Effects of Ethylene Glycol (EG) in CD Rats. *Teratology*, 37, p. 476.

(11) Barrow, M.V. and Taylor, W.J. (1969) A Rapid Method for Detecting Malformations in Rat Foetuses. *Journal of Morphology* 127, 291-306.

(12) Fritz, H. (1974) Prenatal Ossification in Rabbits ss Indicative of Foetal Maturity. *Teratology* 11, p. 313-320.

(13) Gibson, J.P. et al. (1966) Use of the Rabbit in Teratogenicity Studies. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 9, p. 398-408.

(14) Kimmel, C.A. and Wilson, J.G. (1973) Skeletal Deviation in Rats: Malformations or Variations? *Teratology*, 8, p. 309-316.

(15) Marr, M.C. et al. (1992) Developmental Stages of the CD (Sprague-Dawley) Rat Skeleton after Maternal Exposure to Ethylene Glycol. *Teratology*, 46, p. 169-181.

▼B

(16) Monie, I.W. et al. (1965) Dissection Procedures for Rat Foetuses Permitting Alizarin Red Staining of Skeleton and Histological Study of Viscera. *Supplement to Teratology Workshop Manual*, p. 163-173.

(17) Spark, C. and Dawson, A.B. (1928) The Order and Time of appearance of Centers of Ossification in the Fore and Hind Limbs of the Albino Rat, with Special Reference to the Possible Influence of the Sex Factor. *American Journal of Anatomy*, 41, p. 411-445.

(18) Staples, R.E. and Schnell, V.L. (1964) Refinements in Rapid Clearing Technique in the KOH-Alizarin Red S Method for Fetal Bone. *Stain Technology*, 39, p. 61-63.

(19) Strong, R.M. (1928) The Order Time and Rate of Ossification of the Albino Rat (Mus Norvegicus Albinus) Skeleton. *American Journal of Anatomy*, 36, 313-355.

(20) Stuckhardt, J.L. and Poppe, S.M. (1984) Fresh Visceral Examination of Rat and Rabbit Foetuses Used in Teratogenicity Testing. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, 4, p. 181-188.

(21) Walker, D.G. and Wirtschafter, Z.T. (1957) *The Genesis of the Rat Skeleton*. Thomas, Springfield, IL.

(22) Wilson, J.G. (1965) Embryological Considerations in Teratology. In *Teratology: Principles and Techniques,* Wilson J.G. and Warkany J. (eds). University of Chicago, Chicago, IL, p. 251-277.

(23) Wilson, J.G. and Fraser, F.C. (eds). (1977) *Handbook of Teratology*, Vol. 4. Plenum, NY.

(24) Varnagy, L. (1980) Use of Recent Fetal Bone Staining Techniques in the Evaluation of Pesticide Teratogenicity. *Acta Vet. Acad. Sci. Hung.*, 28, p. 233-239.

(25) Staples, R.E. (1974) Detection of visceral Alterations in Mammalian Foetuses. *Teratology*, 9, p. 37-38.

(26) Van Julsingha, E.B. and C.G. Bennett (1977) A Dissecting Procedure for the Detection of Anomalies in the Rabbit Foetal Head. In: *Methods in Prenatal Toxicology* Neubert, D., Merker, H.J. and Kwasigroch, T.E. (eds.). University of Chicago, Chicago, IL, p. 126-144.

(27) US Environmental Protection Agency (1991) Guidelines for Developmental Toxicity Risk Assessment. *Federal Register*, 56, p. 63798-63826.

(28) Wise, D.L. et al. (1997) Terminology of Developmental Abnormalities in Common Laboratory Mammals (Version 1) Teratology, 55, p. 249-292.

▼M4

B.32 ESTUDOS DE CARCINOGENICIDADE

INTRODUÇÃO

1. Este método é equivalente ao *Test Guideline* 451 (2009) da OCDE. O *Test Guideline* 451 (TG 451) inicial relativo aos estudos de carcinogenicidade foi adotado em 1981. Entendeu-se necessário rever o método B.32 para dar conta da evolução recente no domínio do bem-estar animal e da regulamentação (2)(3)(4)(5)(6). A atualização do método B.32 decorreu paralelamente à revisão dos capítulos B.30 ("Estudos de toxicidade crónica") e B.33 ("Estudos combinados de toxicidade crónica e carcinogenicidade") deste anexo. Visa-se obter mais dados a partir dos animais utilizados nos estudos e dispor de mais elementos para a escolha das doses. O método B.32 foi concebido para o ensaio de uma vasta gama de produtos químicos, nomeadamente pesticidas e produtos químicos industriais. Alguns aspetos e requisitos podem, porém, ser diferentes no caso dos produtos farmacêuticos (ver o documento de orientações "*Guidance S1B on Testing for Carcinogenicity of Pharmaceuticals*", publicado pela Conferência Internacional de Harmonização).

2. Na sua maioria, os estudos de carcinogenicidade são efetuados em roedores. Este método destina-se, portanto, a ser aplicado, preferencialmente, a estudos em espécies de roedores. Caso seja necessário efetuar estudos noutras espécies, devem aplicar-se os princípios e procedimentos descritos neste método e no capítulo B.27 deste anexo — "Estudo de toxicidade oral de dose repetida em espécies não roedoras com a duração de 90 dias" (6) —, com as adaptações necessárias. Para mais orientações, consultar o documento de orientações n.º 116 da OCDE, relativo à conceção e realização de estudos de toxicidade crónica e de carcinogenicidade (7).

3. As três vias principais de administração nos estudos de carcinogenicidade são a via oral, a via dérmica e a via inalatória. A via de administração escolhida depende das características físico-químicas do produto químico em estudo e da via predominante de exposição humana. O documento de orientações n.º 116 (7) contém mais informações sobre a escolha da via de exposição.

4. Este método centra-se na exposição por via oral, que é a via habitualmente mais utilizada nos estudos de carcinogenicidade. Embora possa também ser necessário efetuar estudos de carcinogenicidade por via dérmica ou por inalação para avaliar o risco para a saúde humana e/ou isso possa mesmo ser exigido pela regulamentação aplicável, estas duas vias de exposição são bastante complexas do ponto de vista técnico e esses estudos têm de ser concebidos para cada caso concreto. Porém, no que diz respeito às recomendações relativas aos períodos de exposição, aos parâmetros clínicos e patológicos e a outros aspetos, o método aqui descrito para caracterização e avaliação da carcinogenicidade por administração oral pode constituir a base de um protocolo para estudos por inalação e/ou por via dérmica. A OCDE publicou orientações relativas ao estudo da administração de produtos químicos por via dérmica (7) e por inalação (7)(8). Para a conceção de estudos a longo prazo com exposição por via inalatória, recomenda-se especificamente a consulta dos capítulos B.8 (9) e B.29 (10) deste anexo e do documento de orientações da OCDE relativo a ensaios de toxicidade aguda por inalação (8). No caso dos ensaios por via dérmica, deve consultar-se o capítulo B.9 (11) deste anexo.

▼M4

5. Os estudos de carcinogenicidade fornecem informações sobre os perigos para a saúde que podem potencialmente advir da exposição repetida durante um período que pode abranger todo o tempo de vida da espécie utilizada. Estes estudos fornecem informações sobre os efeitos tóxicos do produto químico em causa, incluindo o potencial de carcinogénese, podendo indicar os órgãos afetados e a possibilidade de acumulação. Podem igualmente servir para obter estimativas do nível sem observação de efeitos adversos ("*no observed adverse effect level*", NOAEL) para efeitos tóxicos e, no caso dos produtos cancerígenos não genotóxicos, para respostas tumorais, com base nas quais se podem estabelecer critérios de segurança para a exposição humana. Salienta-se a necessidade de um exame clínico cuidadoso dos animais, de modo a obter-se o máximo de informação possível.

6. Entre os objetivos dos estudos de carcinogenicidade efetuados por este método contam-se os seguintes:

— identificação das propriedades cancerígenas do produto químico em estudo suscetíveis de aumentar a incidência de neoplasias ou a proporção de neoplasias malignas, ou de reduzir o tempo que as neoplasias demoram a surgir, comparativamente aos grupos de controlo em paralelo,

— identificação do órgão ou órgãos afetados pela carcinogénese,

— identificação do tempo que as neoplasias demoram a surgir,

— caracterização de relações entre a dose administrada e a resposta tumoral,

— determinação de níveis sem observação de efeitos adversos (NOAEL) ou ponto de partida para o estabelecimento de doses de referência,

— extrapolação de efeitos cancerígenos para doses baixas de exposição humana,

— obtenção de dados para verificação de hipóteses relativas a modos de ação (2)(7)(12)(13)(14)(15).

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

7. Antes de efetuar um estudo com vista à caracterização e avaliação da carcinogenicidade potencial de um produto químico, o laboratório que efetuará os ensaios deve ponderar todas as informações disponíveis sobre o produto químico em causa, a fim de adaptar o estudo de modo a melhorar a eficiência da determinação do potencial cancerígeno e para minimizar o recurso a animais. É especialmente importante conhecer e ter em conta o modo de ação do agente cancerígeno suspeito (2)(7)(12)(13)(14)(15), dado que a conceção ótima do estudo pode ser diferente consoante o produto químico em causa seja ou não um agente cancerígeno/genotóxico reconhecido ou se suspeite ou não de que o possa ser. Para mais orientações sobre o modo de ação, consultar o documento de orientações n.º 116 (9).

8. Entre os elementos que podem ser úteis na conceção do estudo contam-se a identidade, a estrutura química e as propriedades físico-químicas do produto químico em causa, resultados de ensaios de toxicidade (incluindo de genotoxicidade) *in vitro* ou *in vivo*, as utilizações previstas, o potencial de exposição humana, dados (Q)SAR — "*(quantitative) structure-activity relationships*", relações (quantitativas) estrutura/atividade — e dados de mutagenicidade/genotoxicidade, carcinogenicidade e outros dados toxicológicos disponíveis sobre produtos químicos estruturalmente afins, dados toxicocinéticos disponíveis (dados cinéticos associados a uma dose única ou a doses múltiplas) e dados provenientes de outros estudos com exposição repetida.

▼M4

Só deve proceder-se à determinação da carcinogenicidade depois de obtidos dados de toxicidade preliminares provenientes de estudos de toxicidade com repetição da dose administrada durante 28 e/ou 90 dias. Os ensaios a curto prazo da promoção do desencadeamento de cancros também podem fornecer informações úteis. Deve ponderar-se uma abordagem faseada dos ensaios de carcinogenicidade no âmbito da avaliação global dos potenciais efeitos adversos na saúde do produto químico em estudo (16)(17)(18)(19).

9. Antes de iniciar o estudo, devem ser escolhidos, com base no plano experimental e nos objetivos estabelecidos, os métodos estatísticos mais adequados para a análise dos resultados. Entre outros aspetos a considerar, é necessário determinar se o tratamento estatístico deverá contemplar ajustamentos em função do grau de sobrevivência, a análise do risco tumoral acumulado em função do tempo de sobrevivência e a análise do tempo que os tumores demorar a surgir, bem como que tipo de análise deve efetuar-se no caso da morte prematura de todos os animais de um ou mais grupos. Para orientações sobre as análises estatísticas mais adequadas e informação sobre as referências bibliográficas fundamentais dos métodos estatísticos internacionalmente reconhecidos, deve consultar-se o documento de orientações n.º 116 (7), assim como o documento de orientações n.º 35, relativo à análise e avaliação de estudos de toxicidade crónica e de carcinogenicidade (20).

10. Ao realizar um estudo de carcinogenicidade, recomenda-se que sejam sempre seguidos os princípios e considerações orientadores enunciados no *Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation* (n.º 19) da OCDE (21), nomeadamente os expressos no ponto 62 do mesmo, cuja tradução é a seguinte: *"Nos estudos com repetição da dose administrada, se um animal evidenciar sinais clínicos progressivos da deterioração do seu estado, deve tomar-se uma decisão com conhecimento de causa sobre se deve ou não ser eutanasiado. Para isso, deve ponderar-se, nomeadamente, o valor das informações que seriam obtidas no caso de o animal continuar integrado no estudo, relativamente ao estado geral do mesmo. Caso se decida manter o animal no estudo, deve aumentar-se, tanto quanto necessário, a frequência dos exames que lhe são efetuados. Também é possível, sem prejudicar a finalidade do ensaio, suspender temporariamente a administração do produto químico em estudo – se isso reduzir a dor ou sofrimento do animal – ou reduzir a dose administrada".*

11. Para orientações pormenorizadas sobre os princípios aplicáveis à escolha das doses para estudos de toxicidade crónica e de carcinogenicidade e uma discussão dos mesmos, recomenda-se a consulta do documento de orientações n.º 116 (7) e das publicações com as referências 22 e 23 do *International Life Sciences Institute*. A estratégia de base para escolha das doses depende do objetivo ou objetivos principais do estudo (ver o ponto 6). Para escolher doses adequadas, importa estabelecer um equilíbrio entre, por um lado, a identificação dos perigos em jogo e, por outro, a caracterização e importância das respostas às doses reduzidas. Este equilíbrio é especialmente necessário quando se realizam estudos combinados de toxicidade crónica e de carcinogenicidade (capítulo B.33 deste anexo) — ver o ponto 12.

12. Deve ponderar-se a oportunidade de efetuar um estudo combinado de toxicidade crónica e de carcinogenicidade (capítulo B.33 deste anexo), em vez de efetuar separadamente um estudo de toxicidade crónica (capítulo B.30 deste anexo) e um estudo de carcinogenicidade (o presente método B.32). O estudo combinado é mais favorável, em termos de tempo e de custos, do que dois estudos distintos e não prejudica a qualidade dos dados obtidos na etapa de toxicidade crónica nem na etapa de carcinogenicidade. Ao efetuar um estudo combinado de toxicidade crónica e de carcinogenicidade (capítulo B.33 deste anexo), é, porém, necessário prestar especial atenção aos princípios relativos à escolha das doses (pontos 11 e 22 a 25). Reconhece-se, porém, que determinadas regulamentações podem exigir a realização de estudos separados.

▼M4

13. No final do capítulo e no documento de orientações n.º 116 (7) definem-se alguns conceitos utilizados neste método.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

14. Administra-se diariamente, normalmente por via oral, o produto químico em estudo a vários grupos de animais, em doses crescentes de grupo para grupo, durante grande parte do tempo de vida dos animais. A via inalatória ou a via dérmica também podem ser adequadas. Verifica-se atentamente se os animais evidenciam sinais de toxicidade ou se neles estão a desenvolver-se lesões neoplásicas. Autopsia-se os animais que morrem ou são eutanasiados durante os ensaios. No final dos ensaios, eutanasia-se e autopsia-se os animais sobreviventes.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Escolha da espécie animal

15. Este método trata, em especial, da caracterização e avaliação da carcinogenicidade em roedores (ver o ponto 2). Pode ponderar-se o recurso a outras espécies se os dados disponíveis indicarem que as espécies em causa permitem prever melhor os efeitos na saúde humana. É necessário justificar a escolha da espécie. Embora possa recorrer-se a outras espécies de roedores, como o ratinho, a espécie preferida é o rato. Se bem que os estudos de carcinogenicidade no ratinho possam ser de pouca utilidade (24)(25)(26), alguns programas obrigatórios continuam a exigir ensaios de carcinogenicidade nessa espécie, a menos que se demonstre que, do ponto de vista científico, este estudo não é necessário. O rato e o ratinho constituem os modelos experimentais preferidos devido à sua longevidade relativamente reduzida, à sua utilização generalizada em estudos farmacológicos e toxicológicos, à sua sensibilidade à indução de tumores e à disponibilidade de estirpes suficientemente caracterizadas destas espécies. Em consequência disto, dispõe-se de numerosos dados sobre a fisiologia e patologia destes animais. O documento de orientações n.º 116 (7) contém mais informações sobre a escolha da espécie e da estirpe.

16. Devem ser utilizados animais adultos, jovens e saudáveis de estirpes laboratoriais correntes. De preferência, o estudo de carcinogenicidade deve ser realizado com animais da mesma estirpe e proveniência que os utilizados no estudo ou estudos preliminares mais curtos. Todavia, se os animais da estirpe e proveniência em questão não corresponderem reconhecidamente aos critérios normalmente aceites de sobrevivência em estudos de longo prazo — ver o documento de orientações n.º 116 (7) —, deve ponderar-se a utilização de uma estirpe animal cuja taxa de sobrevivência no estudo a longo prazo seja aceitável. As fêmeas utilizadas devem ser nulíparas e não podem estar grávidas.

Condições de alojamento e de alimentação

17. Os animais podem ser alojados individualmente ou em pequenos grupos do mesmo sexo. É necessário justificar cientificamente a opção pelo alojamento individual (27)(28)(29). As gaiolas devem ser dispostas de forma a minimizar possíveis efeitos derivados do seu posicionamento. A temperatura do biotério deve ser de 22 °C ± 3 °C. A humidade relativa deve estar compreendida entre 50 % e 60 %, embora sejam aceitáveis valores compreendidos entre 30 %, no mínimo, e um valor máximo que, preferencialmente, não deve exceder 70 %, salvo durante os períodos de limpeza do biotério. A iluminação deve ser artificial, com uma sequência de 12 horas de luz seguidas de 12 horas de escuridão. Na alimentação, podem utilizar-se dietas convencionais de laboratório e deve ser fornecida água de beber sem restrições. A dieta deve satisfazer as necessidades nutricionais da espécie estudada. Os teores de contaminantes da dieta — resíduos de pesticidas,

▼M4

poluentes orgânicos persistentes, fitoestrogénios, metais pesados, micotoxinas e outros – podem influenciar os resultados dos ensaios e devem ser os mais baixos possíveis. É necessário obter periodicamente dados analíticos relativos aos teores de nutrientes e de contaminantes da dieta, pelo menos no início do estudo e quando se muda de lote. Estes dados devem constar do relatório final. É igualmente necessário dispor de dados analíticos da água de beber utilizada no estudo. Quando o produto químico em estudo é administrado por via alimentar, a escolha da dieta pode ser influenciada pela necessidade de nela misturar convenientemente esse produto químico e de satisfazer simultaneamente as exigências nutricionais dos animais.

Preparação dos animais

18. Os animais utilizados devem ser saudáveis e ter sido aclimatados às condições laboratoriais durante, pelo menos, sete dias e não devem ter participado em experiências anteriores. No caso dos roedores, a administração do produto químico em estudo deve iniciar-se logo que possível após o desmame e a aclimatação, de preferência antes de os animais completarem oito semanas. É necessário caracterizar a espécie, a estirpe, a proveniência, o sexo, o peso e a idade dos animais utilizados no estudo. No início do estudo, as diferenças de peso entre os animais de cada sexo devem ser mínimas, não se desviando mais de 20 % do peso médio de todos os animais de cada sexo nele utilizados. Distribuem-se aleatoriamente os animais pelos grupos de controlo e pelos grupos expostos. Depois da distribuição aleatória dos animais, a média de peso corporal não deve diferir significativamente de grupo para grupo de animais do mesmo sexo. Se houver diferenças com significado estatístico, os animais devem, se possível, ser redistribuídos aleatoriamente. Deve atribuir-se a cada animal um número de identificação único, com o qual o animal seja identificado por tatuagem, implantação de *microchip* ou outro método adequado.

PROCEDIMENTO

Número e sexo dos animais

19. Devem ser utilizados animais de ambos os sexos. O número de animais utilizados deve ser suficiente para uma avaliação biológica e estatística aprofundada. Cada grupo de dose e cada grupo de controlo em paralelo não deve, portanto, ter menos de 50 animais de cada sexo. Consoante a finalidade do estudo, poderá aumentar-se a representatividade estatística das principais estimativas distribuindo desigualmente os animais pelos vários grupos de dosagem, constituindo grupos com mais de 50 animais para as doses mais baixas, por exemplo, para estimar o potencial cancerígeno a doses baixas. Todavia, importa ter presente que um aumento ligeiro do tamanho dos grupos aumenta relativamente pouco a representatividade estatística do estudo. O documento de orientações n.º 116 (7) contém mais informações sobre a conceção estatística do estudo e a escolha das doses para maximizar a representatividade estatística.

Eutanásias intercalares e grupos satélites (sentinelas)

20. Caso se justifique do ponto de vista científico, pode prever-se a realização de eutanásias intercalares, por exemplo, ao fim de doze meses, para obter informações sobre a evolução das alterações neoplásicas, bem como dados mecanísticos. Caso já se disponha desses dados, obtidos em estudos de toxicidade por dose repetida realizados com o produto químico em causa, as eutanásias em questão podem não se justificar cientificamente. Caso esteja prevista no estudo a realização de eutanásias intercalares, o número de animais a utilizar com essa finalidade em cada grupo de dose é normalmente de dez de cada sexo. Nesse caso, o número total de animais utilizado no estudo deve ser aumentado no número de animais a eutanasiar antes da conclusão do mesmo. Pode prever-se um grupo de animais sentinelas (habitualmente cinco animais de cada sexo) para verificar, se necessário, o aparecimento de doenças durante o estudo (30). Para mais informações, consultar o documento de orientações n.º 116 (7).

▼M4

Grupos de dose e dosagens

21. O documento de orientações n.º 116 (7) contém orientações relativas a todos os aspetos relacionados com a escolha das doses e os intervalos entre estas. Devem ser utilizados pelo menos três doses e um controlo em paralelo. As doses baseiam-se, normalmente, nos resultados de estudos exploratórios das doses ou de estudos de dose repetida por períodos mais curtos e devem atender aos dados toxicológicos e toxicocinéticos disponíveis sobre o produto químico em estudo ou produtos químicos afins.

22. A menos que tal dose esteja limitada pelas características físico-químicas ou pelos efeitos biológicos do produto químico em estudo, deve escolher-se para dose mais elevada o nível que permita identificar os principais órgãos afetados e os efeitos tóxicos principais sem causar sofrimento, efeitos tóxicos intensos, morbidez nem mortalidade. Tendo presente o referido no ponto 23, normalmente escolhe-se para dose mais elevada uma dose que induza efeitos tóxicos, evidenciados, por exemplo, por uma redução (aproximadamente de 10 %) do ganho de peso corporal. Todavia, consoante os objetivos do estudo (ver o ponto 6), pode escolher-se uma dose máxima inferior à que evidencia efeitos tóxicos, por exemplo, se essa dose induzir um efeito adverso preocupante, mas com pouca influência na longevidade ou no peso corporal dos animais.

23. Podem ser escolhidos doses e intervalos entre doses que permitam estabelecer uma relação dose-resposta e, consoante o modo de ação do produto químico em estudo, determinar um NOAEL ou outro resultado pretendido do estudo, por exemplo, uma dose de referência (ver o ponto 25) ao nível de dose mais baixo. Entre os fatores a ter em conta na escolha das doses mais baixas, contam-se o declive esperado da curva dose-resposta, as doses às quais podem ocorrer alterações importantes ao nível metabólico ou do modo da ação tóxica, o nível ao qual se prevê a ocorrência de um limiar e o nível ao qual se prevê fixar o ponto de partida de extrapolações para doses mais baixas.

24. O intervalo entre as doses depende das características do produto químico em estudo e não pode ser prescrito neste método. Contudo, a utilização de intervalos definidos por um fator de 2 a 4 entre doses consecutivas dá frequentemente bons resultados nestes ensaios, sendo muitas vezes melhor ensaiar um quarto grupo do que recorrer a intervalos muito grandes (por exemplo, mais do que um fator de 6 a 10) entre as dosagens. Em geral, são de evitar fatores superiores a 10. Caso contrário, é necessário justificá-los.

25. Conforme se explica mais em pormenor no documento de orientações n.º 116 (7), entre os aspetos a ter em conta na escolha das doses contam-se os seguintes:

— relações não lineares ou pontos de inflexão conhecidos ou de que se suspeite na curva dose-resposta,

— aspetos toxicocinéticos e doses às quais ocorra, ou não ocorra, indução metabólica, saturação ou não linearidade entre as doses externas e as doses internas,

— lesões precursoras, marcadores de efeitos ou indicadores de processos biológicos fundamentais subjacentes em curso,

— aspetos fundamentais (ou de que se suspeite) do modo de ação, tais como as doses às quais começam a manifestar-se efeitos citotóxicos, os níveis hormonais são perturbados, os mecanismos homeostáticos colapsam, etc.,

▼M4

— regiões da curva dose-resposta que necessitam de estimativas especialmente rigorosas, por exemplo, perto da dose de referência prevista ou da dose à qual se suspeite corresponder um limiar,

— níveis previstos de exposição humana.

26. O grupo de controlo deve ser um grupo não exposto ao produto químico em estudo ou, se for usado um veículo para administrar o produto químico, um grupo de controlo do veículo. Salvo no que respeita à exposição ao produto químico em estudo, os animais do grupo de controlo devem ser tratados do mesmo modo que os animais dos grupos ensaiados. Caso se utilize um veículo, o grupo de controlo deve receber o volume máximo de veículo utilizado nos grupos expostos ao produto químico em estudo. Se o produto químico for administrado por via da dieta e reduzir significativamente a quantidade desta ingerida por lhe conferir menor palatabilidade, um grupo de controlo adicional alimentado do mesmo modo, em paralelo, pode constituir um grupo de controlo mais adaptado.

Preparação das doses e administração do produto químico em estudo

27. O produto químico em estudo é normalmente administrado por via oral, através da dieta ou da água de beber ou por intermédio de uma sonda esofágica. O documento de orientações n.º 116 (7) contém mais informações sobre vias e métodos de administração. A via e o método de administração dependem do objetivo do estudo, bem como das propriedades físico-químicas e biodisponibilidade do produto químico em causa e da via e do método de exposição humana predominantes. É necessário fundamentar a via e o método de administração escolhidos. Por razões de bem-estar animal, normalmente só deve optar-se pela utilização de uma sonda esofágica no caso dos agentes relativamente aos quais a via oral e este método de administração representem razoavelmente a exposição humana potencial (por exemplo, através da ingestão de produtos farmacêuticos). No caso dos produtos químicos ingeridos com os alimentos ou disseminados no ambiente, nomeadamente pesticidas, a administração habitual é por incorporação na dieta ou na água de beber. Todavia, para outros cenários — caso da exposição profissional —, pode justificar-se a administração por outras vias.

28. Se necessário, pode suspender-se ou dissolver-se o produto químico em estudo num veículo apropriado. Devem ser tidos em conta as seguintes características que se justifiquem do veículo e de outros aditivos: efeitos na absorção, na distribuição, no metabolismo ou na retenção do produto químico em causa, efeitos nas propriedades químicas do produto químico em estudo suscetíveis de alterarem as características tóxicas do mesmo e efeitos no consumo de alimentos, na ingestão de água ou no estado nutricional dos animais. Recomenda-se que, sempre que possível, a primeira opção seja uma solução ou suspensão aquosa; caso tal não seja viável, pode optar-se por uma solução ou emulsão num óleo (por exemplo, em óleo de milho); em último caso, poderá recorrer-se a uma solução noutro veículo. Se o veículo utilizado não for água, é necessário conhecer as suas características de toxicidade. Deve dispor-se de informações sobre a estabilidade do produto químico em estudo e a homogeneidade das soluções ou rações de dosagem (consoante o caso) nas condições de administração (por exemplo, por via da dieta).

29. É importante assegurar que a quantidade de um produto químico em estudo administrada através da dieta ou da água de beber não interfere nas exigências normais de nutrição nem no equilíbrio hídrico. No caso dos estudos de toxicidade a longo prazo nos quais o produto químico seja administrado pela via alimentar, a concentração deste nos alimentos não deve, normalmente, exceder 5 % da ração total, a fim de evitar desequilíbrios nutricionais. Se o produto químico em estudo for administrado por via da dieta, pode optar-se por concentrações constantes nesta (mg/kg de alimentos ou ppm) ou por doses constantes em relação ao peso corporal do animal (mg/kg de peso corporal), calculadas semanalmente. Deve indicar-se a opção tomada.

▼M4

30. Em caso de administração por via oral, os animais recebem uma dose quotidiana (sete dias por semana) do produto químico em estudo, no caso dos roedores normalmente durante 24 meses (ver também o ponto 32), É necessário justificar qualquer outro regime de dosagem (por exemplo, cinco dias por semana). Em caso de administração por via dérmica, os animais são normalmente expostos ao produto químico em estudo durante, pelo menos, seis horas por dia, sete dias por semana, conforme se descreve no capítulo B.9 (11) deste anexo, ao longo de 24 meses. A exposição por via inalatória é efetuada durante seis horas por dia, sete dias por semana. Todavia, caso se justifique, também podem expor-se os animais durante cinco dias por semana. O período de exposição neste caso é normalmente de 24 meses. Se espécies que não o rato forem sujeitas a exposição unicamente nasal, pode ajustar-se a duração máxima da exposição para minimizar a tensão gerada na espécie em causa. Se a duração da exposição for inferior a seis horas por dia, é necessário fundamentá-lo. Ver também o capítulo B.8 (9) deste anexo.

31. A administração do produto químico aos animais por meio de uma sonda esofágica deve efetuar-se à mesma hora do dia por meio de um tubo estomacal ou de uma cânula de intubação adequada. Normalmente, administra-se a dose diária de uma só vez. Porém, se o produto químico for, por exemplo, um irritante local, pode repartir-se a mesma dose diária por dois momentos. O volume máximo de líquido que pode ser administrado de cada vez depende do tamanho do animal e deve ser o mínimo possível. No caso dos roedores, normalmente não deve exceder 1 ml/100 g de peso corporal (31). Para minimizar diferenças entre volumes administrados, Devem ser efetuados ajustes nas concentrações, de forma que o volume seja o mesmo para todas as doses. Excetuam-se os produtos químicos potencialmente corrosivos ou irritantes, que têm de ser diluídos para evitar efeitos locais intensos. Devem evitar-se concentrações que possam provocar efeitos corrosivos ou irritantes no tubo digestivo.

Duração do estudo

32. No caso dos roedores, normalmente a duração do estudo é de 24 meses, o que representa grande parte do tempo de vida dos animais utilizados. Consoante o tempo de vida dos animais da estirpe de espécie utilizada no estudo, este pode ser mais curto ou mais longo, mas é necessário justificá-lo. No caso de determinadas estirpes de ratinhos (por exemplo, AKR/J, C3H/J ou C57BL/6J), pode ser adequada uma duração do estudo de 18 meses. Seguem-se algumas orientações sobre a duração do estudo, o termo deste e a sobrevivência. Para mais orientações, nomeadamente no que respeita aos critérios para considerar a carcinogenicidade negativa com base na sobrevivência dos animais estudados, consultar o documento de orientações n.º 116 da OCDE, relativo à conceção e realização de estudos de toxicidade crónica e de carcinogenicidade (7).

— deve ponderar-se pôr termo ao estudo quando o número de sobreviventes do grupo exposto à dose mais baixa ou do grupo de controlo descer abaixo de 25 %,

— se apenas morrerem prematuramente devido a efeitos tóxicos animais do grupo exposto à dose mais elevada, não deve pôr-se termo ao estudo,

— a sobrevivência dos animais deve ser examinada separadamente para cada sexo,

— o estudo não deve prolongar-se além do estádio em que os dados dele extraíveis deixam de ser suficientes para validar uma avaliação estatística.

▼M4

EXAMES

33. Normalmente no início e no final de cada dia, incluindo fins de semana e feriados, devem verificar-se os casos de morbidez ou mortalidade no conjunto dos animais. Verifica-se igualmente, uma vez por dia, se os animais têm sinais com importância toxicológica, tendo em conta, no caso da administração por sonda esofágica, o período previsto de efeitos mais acentuados após a administração do produto químico. Deve prestar-se especial atenção ao desenvolvimento de tumores, registando-se o tempo decorrido até ao aparecimento destes e o local, as dimensões, o aspeto e a progressão de cada tumor visível na observação macroscópica ou identificável por palpação.

Peso corporal, consumo de alimentos e de água, eficiência alimentar

34. Todos os animais devem ser pesados no início da exposição, pelo menos uma vez por semana nas primeiras treze semanas e, a partir daí, pelo menos uma vez por mês. Deve medir-se o consumo de alimentos e a eficiência alimentar pelo menos uma vez por semana nas primeiras treze semanas e, a partir daí, pelo menos uma vez por mês. Se o produto químico em estudo for administrado através da água de beber, deve medir-se o consumo de água pelo menos uma vez por semana nas primeiras treze semanas e, a partir daí, pelo menos uma vez por mês. Pode ser útil medir o consumo de água também no caso dos estudos em que se verifiquem alterações do comportamento dos animais a esse nível.

Análises hematológicas e de bioquímica clínica e outras determinações

35. A fim de extrair um máximo de informações do estudo, sobretudo no que respeita ao modo de ação, fica ao critério do diretor do estudo proceder à colheita de amostras de sangue para análises hematológicas e de bioquímica clínica. Pode também ser útil efetuar análises de urina. Para mais orientações sobre o interesse da colheita dessas amostras num estudo de carcinogenicidade, consultar o documento de orientações n.º 116 (7). Se forem consideradas úteis, pode proceder-se à colheita de amostras de sangue para análises hematológicas e de bioquímica clínica, bem como de amostras de urina para as análises respetivas, quando das eutanásias intercalares (ver o ponto 20) e a, pelo menos, dez animais de cada sexo, por grupo, no termo do estudo. As amostras de sangue devem ser colhidas, sob anestesia, num ponto determinado a indicar, por exemplo, por punção cardíaca ou no seio retro-orbital. Se for necessário conservá-las, devem sê-lo em condições adequadas. Podem igualmente preparar-se esfregaços de sangue para exame, em especial se o órgão afetado for a medula óssea. Todavia, tem sido questionada (32) a utilidade deste exame para a avaliação do potencial cancerígeno/oncogénico.

PATOLOGIA

Autópsia macroscópica

36. Deve ser realizada a todos os animais estudados — exceto os animais sentinelas (ver o ponto 20) e outros animais satélites — uma autópsia macroscópica completa e pormenorizada através do exame cuidadoso da superfície exterior do corpo, dos orifícios, das cavidades craniana, torácica e abdominal e do conteúdo de cada uma destas. Fica ao critério do diretor do estudo decidir em que casos é necessário autopsiar animais sentinelas ou outros animais satélites. A pesagem de órgãos normalmente não faz parte dos estudos de carcinogénese, dado que as alterações geriátricas e o desenvolvimento de tumores em fases avançadas diminuem a utilidade dessas pesagens. Todavia, estas pesagens podem ter muita importância nas avaliações baseadas na suficiência da prova, sobretudo no que respeita ao modo de ação. Se fizerem parte de estudos satélites, devem recolher-se estes dados o mais tardar um ano após o início do estudo.

▼**M4**

37. Os tecidos a seguir indicados devem conservar-se no meio de fixação mais adequado ao tipo de tecido em causa e ao exame histopatológico previsto (33) — os tecidos entre parênteses retos são facultativos:

todas as lesões macroscópicas	coração	pâncreas	estômago (pré-estômago, estômago glandular)
glândulas suprarrenais	íleo	glândulas paratiroides	[dentes]
aorta	jejuno	nervo periférico	testículos
encéfalo (incluindo secções dos hemisférios cerebrais, do cerebelo e da medula/protuberância anelar)	rins	hipófise	timo
cego	glândulas lacrimais (exo-orbitais)	próstata	tiroide
colo do útero	fígado	reto	[língua]
glândulas de coagulação	pulmões	glândulas salivares	traqueia
cólon	gânglios linfáticos (superficiais e profundos)	vesículas seminais	bexiga urinária
duodeno	glândulas mamárias (obrigatório no caso das fêmeas e, nos machos, se for claramente dissecável)	músculo esquelético	útero, incluindo o colo do útero
epidídimo	[vias respiratórias superiores, incluindo o nariz, os cornetos e os seios paranasais]	pele	[ureteres]
olhos (incluindo a retina)	esófago	medula espinal (a três níveis: cervical, mediotorácico e lombar)	[uretra]
[fémur com articulação]	[bolbo olfativo]	baço	vagina
vesícula biliar (exceto no caso do rato)	ovários	[esterno]	secção da medula óssea e/ /ou uma punção recente de medula óssea
glândulas de Harder			

No caso dos órgãos emparelhados (por exemplo, os rins e as glândulas suprarrenais), devem conservar-se ambos. Os resultados clínicos ou outros podem aconselhar o exame de outros tecidos. Devem conservar-se também todos os órgãos que as propriedades conhecidas do produto químico em estudo indiciem que serão provavelmente afetados. Nos estudos por via dérmica, os órgãos a conservar são ainda os constantes da lista relativa à exposição por via oral, mas é essencial proceder igualmente à amostragem e à conservação de pele do local onde o produto químico em estudo foi aplicado. Nos estudos por inalação, a lista de tecidos do aparelho respiratório a conservar e a examinar deve seguir as recomendações dos capítulos B.8 e B.29 deste anexo. A lista de outros órgãos e tecidos a examinar neste caso (além dos tecidos do aparelho respiratório a conservar já especificados) é a estabelecida para a exposição por via oral.

▼M4

Histopatologia

38. A referência 33 contém orientações sobre as melhores práticas a seguir na realização de estudos de patologias toxicológicas. Os exames devem incidir, no mínimo, nos seguintes tecidos:

— todos os tecidos dos animais dos grupos de controlo e dos grupos expostos à dose mais elevada,

— todos os tecidos dos animais que morreram ou foram eutanasiados durante o estudo,

— todos os tecidos com anomalias macroscópicas, incluindo tumores,

— os tecidos que revelaram alterações histopatológicas atribuíveis à exposição do produto químico em estudo nos animais dos grupos expostos à dose mais elevada, de todos os animais de todos os outros grupos expostos a uma dose do produto químico,

— no caso dos órgãos emparelhados (por exemplo, os rins e as glândulas suprarrenais), devem examinar-se ambos.

DADOS E RELATÓRIOS

Dados

39. Deve apresentar-se os dados por animal relativos a todos os parâmetros avaliados. Esses dados devem ainda ser resumidos num quadro, indicando, para cada grupo estudado, o número de animais no início do ensaio, o número de animais que morreram durante o ensaio ou que foram eutanasiados, a hora de cada morte ou eutanásia, o número de animais que apresentaram sinais de toxicidade, a descrição dos sinais de toxicidade observados, nomeadamente o momento do seu aparecimento e a sua duração e intensidade, o número de animais que apresentaram lesões, o tipo de lesões e a percentagem de animais que apresentaram cada tipo de lesão. Devem constar dos quadros de resumo dos dados as médias e os desvios-padrão (no caso dos dados contínuos) correspondentes aos animais que apresentaram lesões ou efeitos tóxicos, além do grau das lesões.

40. Os dados históricos de controlo podem ser úteis para a interpretação dos resultados do estudo, por exemplo, quando houver indicações de que os dados provenientes dos grupos de controlo em paralelo divergem significativamente de dados recentes referentes a animais de controlo da mesma colónia e da mesma unidade de ensaio. Caso sejam avaliados dados históricos de controlo, estes devem provir do mesmo laboratório, reportar-se a animais da mesma idade e estirpe e ter sido gerados nos cinco anos anteriores ao estudo em causa.

41. Quando pertinente, devem avaliar-se os resultados numéricos por um método estatístico corrente adequado. Os métodos estatísticos e os dados a analisar devem ser escolhidos no planeamento do estudo (ponto 9). Nessa escolha, devem prever-se os ajustamentos em função do grau de sobrevivência que se revelem necessários.

Relatório dos ensaios

42. Dados a constar do relatório dos ensaios:

Produto químico em estudo:

— natureza física, grau de pureza e propriedades físico-químicas,

— dados de identificação,

▼M4

— proveniência,

— número de lote,

— boletim de análises químicas.

Veículo (se for o caso):

— justificação da escolha do veículo (se não for água).

Animais estudados:

— espécie e estirpe utilizadas e justificação da opção tomada,

— número, idade e sexo dos animais no início dos ensaios,

— proveniência, condições de alojamento, dieta, etc.,

— peso de cada animal no início do ensaio.

Condições de realização dos ensaios:

— fundamentação da via de administração e das doses escolhidas,

— métodos estatísticos utilizados na análise dos dados, se for o caso,

— elementos relativos à formulação do produto químico em estudo/à incorporação do mesmo na dieta fornecida aos animais,

— dados analíticos relativos à concentração atingida, estabilidade e homogeneidade da preparação,

— via de administração e elementos relativos à administração do produto químico em estudo,

— no caso dos estudos por inalação: exposição unicamente nasal ou de corpo inteiro,

— doses reais (mg/kg de peso corporal/dia) e, se for caso disso, fator de conversão entre a concentração do produto químico em estudo na dieta ou na água de beber (mg/kg ou ppm) e a dose real,

— pormenores relativos à qualidade dos alimentos e da água.

Resultados (apresentar quadros de resumo dos dados e os dados por animal):

Informações gerais

— dados de sobrevivência,

— pesos corporais e alterações de peso corporal,

— consumo de alimentos, cálculos da eficiência alimentar (se efetuados) e consumo de água (se for caso disso),

— dados toxicocinéticos, se disponíveis,

— resultados oftalmoscópicos, se disponíveis,

— resultados hematológicos, se disponíveis,

— resultados de química clínica, se disponíveis.

▼M4

Resultados dos exames clínicos

— sinais de toxicidade,

— incidência (e, se quantificada, intensidade) das anomalias observadas,

— natureza, intensidade e duração dos sinais clínicos observados (reversíveis ou irreversíveis).

Dados das autópsias

— peso corporal terminal,

— peso de cada órgão (e relação com o peso corporal, se for caso disso),

— resultados das autópsias; incidência e intensidade das anomalias.

Histopatologia

— observação de efeitos histopatológicos não neoplásicos,

— observação de efeitos histopatológicos neoplásicos,

— correlação entre as observações macroscópicas e os resultados microscópicos,

— descrição pormenorizada dos resultados histopatológicos resultantes da exposição dos animais ao produto químico em estudo, incluindo a classificação de intensidade,

— relatórios do eventual exame das lâminas por pares especialistas.

Tratamento estatístico dos resultados, se for caso disso.

Discussão dos resultados, nomeadamente:

— discussão dos eventuais modelos,

— relações dose-resposta,

— dados históricos de controlo,

— análise dos dados disponíveis sobre modos de ação,

— determinação das doses de referência, do NOAEL e do LOAEL,

— importância para o ser humano.

Conclusões

REFERÊNCIAS:

(1) OCDE (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995). Documento de trabalho interno. Environment Directorate, OCDE, Paris.

(2) EPA (2005). Guidelines for Carcinogen Risk Assessment. Risk Assessment Forum, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.

(3) Combes R.D., Gaunt, I., Balls M. (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. *ATLA* 32:163-208.

(4) Barlow S.M., Greig J.B., Bridges J.W. *et al.* (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. *Food. Chem. Toxicol.* 40:145-191.

(5) Chhabra R.S., Bucher J.R., Wolfe M., Portier C. (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 206:437-445.

▼**M4**

(6) Capítulo B.27 deste anexo, "Ensaio de toxicidade oral subcrónica – Estudo de toxicidade oral de dose repetida em espécies não roedoras com a duração de 90 dias".

(7) OCDE (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 – segunda edição. Series on Testing and Assessment No. 116. Disponível no sítio Web público de *Test Guidelines* da OCDE (www.oecd.org/env/testguidelines).

(8) OCDE (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Series on Testing and Assessment No. 39. ENV/JM/MONO(2009)28, OCDE, Paris.

(9) Capítulo B.8 deste anexo, "Toxicidade subaguda por inalação: Estudo de 28 dias".

(10) Capítulo B.29 deste anexo, "Toxicidade subcrónica por inalação: Estudo de 90 dias".

(11) Capítulo B.9 deste anexo, "Toxicidade (dérmica) da dose repetida (28 dias)".

(12) Boobis A.R., Cohen S.M., Dellarco V., McGregor D., Meek M.E., Vickers C., Willcocks D., Farland W. (2006). IPCS Framework for analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans. *Crit. Rev. in Toxicol.*, 36:793-801.

(13) Cohen S.M., Meek M.E., Klaunig J.E., Patton D.E., Fenner-Crisp P.A. (2003). The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: An Overview. *Crit. Rev. Toxicol.* 33:581-589.

(14) Holsapple M.P., Pitot H.C., Cohen S.N., Boobis A.R., Klaunig J.E., Pastoor T., Dellarco V.L., Dragan Y.P. (2006). Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk. *Toxicol. Sci.* 89:51-56.

(15) Meek E.M., Bucher J.R., Cohen S.M., Dellarco V., Hill R.N., Lehman-McKemmon L.D., Longfellow D.G., Pastoor T., Seed J., Patton D.E. (2003). A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action. *Crit. Rev. Toxicol.* 33:591-653.

(16) Carmichael N.G., Barton H.A., Boobis A.R. *et al.* (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. *Critical Reviews in Toxicology* 36:1-7.

(17) Barton H.A., Pastoor T.P., Baetcke T. *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. *Critical Reviews in Toxicology* 36:9-35.

(18) Doe J.E., Boobis A.R., Blacker A. *et al.* (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. *Critical Reviews in Toxicology* 36:37-68.

(19) Cooper R.L., Lamb J.S., Barlow S.M. *et al.* (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. *Critical Reviews in Toxicology* 36:69-98.

(20) OCDE (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies. Series on Testing and Assessment No. 35; Series on Pesticides No. 14. ENV/JM/MONO(2002)19, OCDE, Paris.

(21) OCDE (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Series on Testing and Assessment No. 19. ENV/JM/MONO(2000)7, OCDE, Paris.

▼M4

(22) Rhomberg L.R., Baetcke K., Blancato J., Bus J., Cohen S., Conolly R., Dixit R., Doe J., Ekelman K., Fenner-Crisp P., Harvey P., Hattis D., Jacobs A., Jacobson-Kram D., Lewandowski T., Liteplo R., Pelkonen O., Rice J., Somers D., Turturro A., West, W., Olin S. (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection. *Crit. Rev. Toxicol.* 37(9):729-837.

(23) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran J.A. (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.

(24) Griffiths S.A., Parkinson C., McAuslane J.A.N., Lumley C.E. (1994). The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals. *The Toxicologist* 14(1):214.

(25) Usui T., Griffiths S.A., Lumley C.E. (1996). The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals. *In* D'Arcy POF & Harron DWG (eds.). Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation. Queen's University Press, Belfast, p. 279-284.

(26) Carmichael N.G., Enzmann H., Pate I., Waechter F. (1997). The Significance of Mouse Liver Tumor Formation for Carcinogenic Risk Assessment: Results and Conclusions from a Survey of Ten Years of Testing by the Agrochemical Industry. *Environ Health Perspect.* 105:1196-1203.

(27) Diretiva 2010/63/UE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 22 de setembro de 2010, relativa à proteção dos animais utilizados para fins científicos (JO L 276 de 20.10.2010, p. 33).

(28) National Research Council (1985). Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington, D.C., US Dept. of Health and Human Services.

(29) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255--04-2.

(30) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

(31) Diehl K.-H., Hull R., Morton D., Pfister R., Rabemampianina Y., Smith D., Vidal J.-M., van de Vorstenbosch C. (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *Journal of Applied Toxicology* 21:15-23.

(32) Weingand K., *et al.* (1996). Harmonization of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. *Fund. Appl. Toxicol.* 29:198-201.

(33) Crissman J., Goodman D., Hildebrandt P., *et al.* (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. *Toxicologic Pathology* 32:126-131.

▼**M4**

Apêndice 1

DEFINIÇÃO

Produto químico em estudo: qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado este método de ensaio.

▼M4

B.33. ESTUDOS COMBINADOS DE TOXICIDADE CRÓNICA E CARCINOGENICIDADE

INTRODUÇÃO

1. Este método é equivalente ao *Test Guideline* 453 (2009) da OCDE. O *Test Guideline* TG 453 inicial foi adotado em 1981. Entendeu-se necessário atualizar o método B.33 para dar conta da evolução recente no domínio do bem-estar animal e da regulamentação (1)(2)(3)(4)(5). A atualização do método B.33 decorreu paralelamente à revisão dos capítulos B.32 ("Estudos de carcinogenicidade") e B.30 ("Estudos de toxicidade crónica") deste anexo. Visa-se obter mais dados a partir dos animais utilizados nos estudos e dispor de mais elementos para a escolha das doses. Este método foi concebido para o ensaio de uma vasta gama de produtos químicos, nomeadamente pesticidas e produtos químicos industriais. Alguns aspetos e requisitos podem, porém, ser diferentes no caso dos produtos farmacêuticos (ver o documento de orientações "*Guidance S1B on Testing for Carcinogenicity of Pharmaceuticals*", publicado pela Conferência Internacional de Harmonização).

2. Na sua maioria, os estudos de toxicidade crónica e de carcinogenicidade são efetuados em roedores. Este método destina-se, portanto, a ser aplicado, preferencialmente, a estudos em espécies de roedores. Caso seja necessário efetuar estudos noutras espécies, os princípios e procedimentos descritos neste método e no capítulo B.27 deste anexo — "Estudo de toxicidade oral de dose repetida em espécies não roedoras com a duração de 90 dias" (6) — podem igualmente ser aplicados, com as adaptações necessárias e em observância das orientações do *Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies* (n.º 116) da OCDE (7).

3. As três vias principais de administração nos estudos de toxicidade crónica e carcinogenicidade são a via oral, a via dérmica e a via inalatória. A via de administração escolhida depende das características físico-químicas do produto químico em estudo e da via predominante de exposição humana. O documento de orientações n.º 116 (7) contém mais informações sobre a escolha da via de exposição.

4. Este método centra-se na exposição por via oral, que é a via habitualmente mais utilizada nos estudos de toxicidade crónica e de carcinogenicidade. Embora possa também ser necessário efetuar estudos a longo prazo por via dérmica ou por inalação para avaliar o risco para a saúde humana e/ou isso possa mesmo ser exigido pela regulamentação aplicável, estas duas vias de exposição são bastante complexas do ponto de vista técnico e esses estudos têm de ser concebidos para cada caso concreto. Porém, no que diz respeito às recomendações relativas aos períodos de exposição, aos parâmetros clínicos e patológicos e a outros aspetos, o método aqui descrito para caracterização e avaliação da toxicidade crónica e da carcinogenicidade por administração oral pode constituir a base de um protocolo para estudos por inalação e/ou por via dérmica. A OCDE publicou orientações relativas ao estudo da administração de produtos químicos por inalação (7)(8) e por via dérmica (7). Para a conceção de estudos a longo prazo com exposição por via inalatória, recomenda-se especificamente a consulta dos capítulos B.8 (9) e B.29 (10) deste anexo e do documento de orientações da OCDE relativo a ensaios de toxicidade aguda por inalação (8). No caso dos ensaios por via dérmica, deve consultar-se o capítulo B.9 (11) deste anexo.

▼**M4**

5. Os estudos combinados de toxicidade crónica e carcinogenicidade fornecem informações sobre os perigos para a saúde que podem advir potencialmente da exposição repetida durante um período que pode abranger todo o tempo de vida da espécie utilizada. Estes estudos fornecem informações sobre os efeitos tóxicos do produto químico em causa, incluindo o potencial de carcinogenicidade, bem como indicações sobre os órgãos afetados e a possibilidade de acumulação. Podem igualmente servir para obter estimativas do nível sem observação de efeitos adversos ("*no observed adverse effect level*", NOAEL) para efeitos tóxicos e, no caso dos produtos cancerígenos não genotóxicos, para respostas tumorais, com base nas quais se podem estabelecer critérios de segurança para a exposição humana. Salienta-se a necessidade de um exame clínico cuidadoso dos animais, de modo a obter-se o máximo de informação possível.

6. Entre os objetivos dos estudos de toxicidade crónica e carcinogenicidade efetuados por este método contam-se os seguintes:

— identificação das propriedades cancerígenas do produto químico em estudo suscetíveis de aumentar a incidência de neoplasias ou a proporção de neoplasias malignas, ou de reduzir o tempo que as neoplasias demoram a surgir, comparativamente aos grupos de controlo em paralelo,

— identificação do tempo que as neoplasias demoram a surgir,

— identificação da toxicidade crónica de produtos químicos,

— identificação do órgão ou órgãos afetados pela toxicidade crónica e pela carcinogenicidade,

— caracterização de relações dose-resposta,

— determinação de níveis sem observação de efeitos adversos (NOAEL) ou ponto de partida para o estabelecimento de doses de referência,

— extrapolação de efeitos cancerígenos para doses baixas de exposição humana,

— previsão de efeitos de toxicidade crónica aos níveis da exposição humana,

— obtenção de dados para verificação de hipóteses relativas a modos de ação (2)(7)(12)(13)(14)(15).

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

7. Antes de efetuar um estudo com vista à caracterização e avaliação da carcinogenicidade e da toxicidade crónica potenciais de um produto químico, o laboratório que efetuará os ensaios deve ponderar todas as informações disponíveis sobre o produto químico em causa, a fim de adaptar o estudo de modo a melhorar a eficiência da determinação das propriedades toxicológicas do mesmo e para minimizar o recurso a animais. É especialmente importante conhecer e ter em conta o modo de ação do agente cancerígeno suspeito (2)(7)(12)(13)(14)(15), dado que a conceção ótima do estudo pode ser diferente consoante o produto químico em causa seja ou não um agente cancerígeno/genotóxico reconhecido ou se suspeite ou não de que o possa ser. Para mais orientações sobre o modo de ação, consultar o documento de orientações n.º 116 (7).

8. Entre os elementos que podem ser úteis na conceção do estudo contam-se a identidade, a estrutura química e as propriedades físico-químicas do produto químico em causa, informações disponíveis sobre o modo de ação, resultados de ensaios de toxicidade (incluindo de genotoxicidade) *in vitro* ou *in vivo*, as utilizações previstas, o potencial de exposição humana, dados (Q)SAR — "*(quantitative) structure-activity relationships*", relações (quantitativas) estrutura/atividade — e dados de mutagenicidade/genotoxicidade, carcinogenicidade e outros dados toxicológicos disponíveis sobre produtos químicos estruturalmente afins, dados toxicocinéticos disponíveis (dados cinéticos associados a uma dose única ou a doses múltiplas) e dados provenientes de outros estudos com exposição repetida. Só deve proceder-se à

▼M4

determinação da toxicidade crónica e da carcinogenicidade depois de obtidos dados de toxicidade preliminares provenientes de estudos de toxicidade com repetição da dose administrada durante 28 e/ou 90 dias. Os ensaios a curto prazo da promoção do desencadeamento de cancros também podem fornecer informações úteis. Deve ponderar-se uma abordagem faseada dos ensaios de carcinogenicidade no âmbito da avaliação global dos potenciais efeitos adversos na saúde do produto químico em estudo (16)(17)(18)(19).

9. Antes de iniciar o estudo, devem escolher-se, com base no plano experimental e nos objetivos estabelecidos, os métodos estatísticos mais adequados para a análise dos resultados. Entre outros aspetos a considerar, é necessário determinar se o tratamento estatístico deverá contemplar ajustamentos em função do grau de sobrevivência, a análise do risco tumoral acumulado em função do tempo de sobrevivência e a análise do tempo que os tumores demorar a surgir, bem como que tipo de análise deve efetuar-se no caso da morte prematura de todos os animais de um ou mais grupos. Para orientações sobre as análises estatísticas mais adequadas e informação sobre as referências bibliográficas fundamentais dos métodos estatísticos internacionalmente reconhecidos, deve consultar-se o documento de orientações n.º 116 (7), assim como o documento de orientações n.º 35, relativo à análise e avaliação de estudos de toxicidade crónica e de carcinogenicidade (20).

10. Ao realizar um estudo de carcinogenicidade, recomenda-se que sejam sempre seguidos os princípios e considerações orientadores enunciados no *Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation* da OCDE (21), nomeadamente os expressos no ponto 62 do mesmo, cuja tradução é a seguinte: *"Nos estudos com repetição da dose administrada, se um animal evidenciar sinais clínicos progressivos da deterioração do seu estado, deve tomar-se uma decisão com conhecimento de causa sobre se deve ou não ser eutanasiado. Para isso, deve ponderar-se, nomeadamente, o valor das informações que seriam obtidas no caso de o animal continuar integrado no estudo, relativamente ao estado geral do mesmo. Caso se decida manter o animal no estudo, deve aumentar-se, tanto quanto necessário, a frequência dos exames que lhe são efetuados. Também é possível, sem prejudicar a finalidade do ensaio, suspender temporariamente a administração do produto químico em estudo – se isso reduzir a dor ou sofrimento do animal – ou reduzir a dose administrada".*

11. Para orientações pormenorizadas sobre os princípios aplicáveis à escolha das doses para estudos de toxicidade crónica e de carcinogenicidade e uma discussão dos mesmos, recomenda-se a consulta do documento de orientações n.º 116 (7) e das publicações com as referências 22 e 23 do International Life Sciences Institute. A estratégia de base para escolha das doses depende do objetivo ou objetivos principais do estudo (ver o ponto 6). Para escolher doses adequadas, importa estabelecer um equilíbrio entre, por um lado, a identificação dos perigos em jogo e, por outro, a caracterização e importância das respostas às doses reduzidas. Este equilíbrio é especialmente necessário quando se realizam estudos combinados de toxicidade crónica e de carcinogenicidade.

12. Deve ponderar-se a oportunidade de efetuar este estudo combinado de toxicidade crónica e de carcinogenicidade, em vez de efetuar separadamente um estudo de toxicidade crónica (capítulo B.30 deste anexo) e um estudo de carcinogénese (capítulo B.32 deste anexo). O estudo combinado é mais favorável, em termos de tempo e de custos e de alguma redução do recurso a animais, do que dois estudos distintos e não prejudica a qualidade dos dados obtidos na etapa de toxicidade crónica nem na etapa de carcinogenicidade. Ao efetuar um estudo combinado de toxicidade crónica e de carcinogenicidade, é, porém, necessário prestar especial atenção aos princípios relativos à escolha das doses (pontos 11 e 22 a 26). Reconhece-se, porém, que determinadas regulamentações podem exigir a realização de estudos separados. Para mais orientações sobre a otimização dos estudos combinados de toxicidade crónica e de carcinogenicidade, ao nível das possibilidades de redução do número de animais utilizados e através da racionalização dos procedimentos experimentais, consultar o documento de orientações n.º 116 (7).

▼M4

13. No final do capítulo e no documento de orientações n.º 116 (7) define-se alguns conceitos utilizados neste método.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

14. O estudo consiste em duas etapas em paralelo, uma relativa à toxicidade crónica e outra relativa à carcinogenicidade (ver as durações respetivas nos pontos 34 e 35). Normalmente, administra-se o produto químico por via oral, embora a via inalatória ou a via dérmica também possam ser adequadas. Na etapa relativa à toxicidade crónica, administra-se diariamente o produto químico em estudo a vários grupos de animais, em doses crescentes de grupo para grupo, normalmente durante doze meses, embora possam escolher-se períodos mais longos ou mais curtos em função das exigências da regulamentação (ver o ponto 34). Escolhe-se a duração do estudo de modo a ser suficientemente longa para que os eventuais efeitos de toxicidade acumulada se manifestem, mas sem que sejam perturbados por alterações ligadas ao envelhecimento dos animais. Pode estar prevista a realização de uma ou mais eutanásias intercalares, por exemplo, após três ou seis meses. Nesse caso, pode aumentar-se o número de grupos de animais em conformidade (ver o ponto 20). Na etapa relativa à carcinogenicidade, administra-se diariamente o produto químico em estudo a vários grupos de animais, durante grande parte do tempo de vida dos animais. Verifica-se atentamente, relativamente a ambas as etapas, se os animais evidenciam sinais de toxicidade ou se neles estão a desenvolver-se lesões neoplásicas. Autopsia-se os animais que morrem ou são eutanasiados durante os ensaios. No final dos ensaios, eutanasia-se e autopsia-se os animais sobreviventes.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Escolha da espécie animal

15. Este método trata, em especial, da caracterização e avaliação da toxicidade crónica e da carcinogenicidade em roedores (ver o ponto 2). Pode ponderar-se o recurso a outras espécies se os dados disponíveis indicarem que as espécies em causa permitem prever melhor os efeitos na saúde humana. É necessário justificar a escolha da espécie. Embora possa recorrer-se a outras espécies de roedores, como o ratinho, a espécie preferida é o rato. Se bem que os estudos de carcinogenicidade no ratinho possam ser de pouca utilidade (24)(25)(26), alguns programas obrigatórios continuam a exigir ensaios de carcinogenicidade nessa espécie, a menos que se demonstre que, do ponto de vista científico, este estudo não é necessário. O rato e o ratinho constituem os modelos experimentais preferidos devido à sua longevidade relativamente reduzida, à sua utilização generalizada em estudos farmacológicos e toxicológicos, à sua sensibilidade à indução de tumores e à disponibilidade de estirpes suficientemente caracterizadas destas espécies. Em consequência disto, dispõe-se de numerosos dados sobre a fisiologia e patologia destes animais. Se forem exigidos estudos de toxicidade crónica e carcinogenicidade em espécies que não sejam de roedores, a conceção e realização desses estudos deve basear-se nos princípios descritos no presente método e no capítulo B.27 deste anexo — "Estudo de toxicidade oral de dose repetida em espécies não roedoras com a duração de 90 dias" (6). O documento de orientações n.º 116 (7) contém mais informações sobre a escolha da espécie e da estirpe.

16. Devem ser utilizados animais adultos, jovens e saudáveis de estirpes laboratoriais correntes. De preferência, o estudo combinado de toxicidade crónica e carcinogenicidade deve ser realizado com animais da mesma estirpe e proveniência que os utilizados no estudo ou estudos preliminares mais curtos de toxicidade. Todavia, se os animais da estirpe e proveniência em questão não corresponderem reconhecidamente aos critérios normalmente aceites de sobrevivência em estudos de longo prazo — ver o documento de orientações n.º 116 (7) —, deve ponderar-se a utilização de uma estirpe animal cuja taxa de sobrevivência no estudo a longo prazo seja aceitável. As fêmeas utilizadas devem ser nulíparas e não podem estar grávidas.

▼M4

Condições de alojamento e alimentação

17. Os animais podem ser alojados individualmente ou em pequenos grupos do mesmo sexo. É necessário justificar cientificamente a opção pelo alojamento individual (27)(28)(29). As gaiolas devem ser dispostas de forma a minimizar possíveis efeitos derivados do seu posicionamento. A temperatura do biotério deve ser de 22 °C ± 3 °C. A humidade relativa deve estar compreendida entre 50 % e 60 %, embora sejam aceitáveis valores compreendidos entre 30 %, no mínimo, e um valor máximo que, preferencialmente, não deve exceder 70 %, salvo durante os períodos de limpeza do biotério. A iluminação deve ser artificial, com uma sequência de 12 horas de luz seguidas de 12 horas de escuridão. Na alimentação, podem utilizar-se dietas convencionais de laboratório e deve ser fornecida água de beber sem restrições. A dieta deve satisfazer as necessidades nutricionais da espécie estudada. Os teores de contaminantes da dieta — resíduos de pesticidas, poluentes orgânicos persistentes, fitoestrogénios, metais pesados, micotoxinas e outros — podem influenciar os resultados dos ensaios e devem ser os mais baixos possíveis. É necessário obter periodicamente dados analíticos relativos aos teores de nutrientes e de contaminantes da dieta, pelo menos no início do estudo e quando se muda de lote. Estes dados devem constar do relatório final. É igualmente necessário dispor de dados analíticos da água de beber utilizada no estudo. Quando o produto químico em estudo é administrado por via alimentar, a escolha da dieta pode ser influenciada pela necessidade de nela misturar convenientemente esse produto químico e de satisfazer simultaneamente as exigências nutricionais dos animais.

Preparação dos animais

18. Os animais utilizados devem ser saudáveis e ter sido aclimatados às condições laboratoriais durante, pelo menos, sete dias e não devem ter participado em experiências anteriores. No caso dos roedores, a administração do produto químico em estudo deve iniciar-se logo que possível após o desmame e a aclimatação, de preferência antes de os animais completarem oito semanas. É necessário caracterizar a espécie, a estirpe, a proveniência, o sexo, o peso e a idade dos animais utilizados no estudo. No início do estudo, as diferenças de peso entre os animais de cada sexo devem ser mínimas, não se desviando mais de 20 % do peso médio de todos os animais de cada sexo nele utilizados. Distribuem-se aleatoriamente os animais pelos grupos de controlo e pelos grupos expostos. Depois da distribuição aleatória dos animais, a média de peso corporal não deve diferir significativamente de grupo para grupo de animais do mesmo sexo. Se houver diferenças com significado estatístico, os animais devem, se possível, ser redistribuídos aleatoriamente. Deve atribuir-se a cada animal um número de identificação único, com o qual o animal seja identificado por tatuagem, implantação de *microchip* ou outro método adequado.

PROCEDIMENTO

Número e sexo dos animais

19. Devem ser utilizados animais de ambos os sexos. O número de animais utilizados deve ser suficiente para uma avaliação biológica e estatística aprofundada. No caso dos roedores, cada grupo de dose (ver o ponto 22) e grupo de controlo em paralelo destinado à etapa de carcinogenicidade do estudo não deve, portanto, ter menos de 50 animais de cada sexo. Consoante a finalidade do estudo, poderá aumentar-se a representatividade estatística das principais estimativas distribuindo desigualmente os animais pelos vários grupos de dose, constituindo grupos com mais de 50 animais para as doses mais baixas, por exemplo, para estimar o potencial cancerígeno a doses baixas. Todavia, importa ter presente que um aumento ligeiro do tamanho dos grupos aumenta relativamente pouco a representatividade estatística do estudo. No caso dos roedores, cada grupo de dose (ver o ponto 22) e grupo de controlo em paralelo destinado à etapa de toxicidade crónica do estudo deve ser constituído por, pelo menos, 10 animais de cada

▼M4

sexo, número que é inferior ao utilizado no estudo de toxicidade crónica (capítulo B.30 deste anexo). Todavia, na interpretação dos dados provenientes de grupos com menos animais na etapa de toxicidade crónica deste estudo combinado, são tidos em conta os dados provenientes da etapa de carcinogenicidade, na qual os efetivos são maiores. Nos estudos com ratinhos, pode ser necessário reforçar o número de animais em cada grupo exposto na etapa de toxicidade crónica, para poder realizar todas as determinações hematológicas previstas. O documento de orientações n.º 116 (7) contém mais informações sobre a conceção estatística do estudo e a escolha das doses para maximizar a representatividade estatística.

Eutanásias intercalares, grupo satélite e animais sentinelas

20. Caso se justifique do ponto de vista científico, pode prever-se a realização de eutanásias intercalares – por exemplo, ao fim de seis meses, na etapa de toxicidade crónica — para obter informações sobre a evolução das alterações neoplásicas, bem como dados mecanísticos. Caso já se disponha desses dados, obtidos em estudos de toxicidade por dose repetida realizados com o produto químico em causa, as eutanásias em questão podem não se justificar cientificamente. Os animais utilizados na etapa de toxicidade crónica do estudo — que, normalmente, se prolonga por doze meses (ponto 34) — fornecem dados equiparados aos de uma eutanásia intercalar para a etapa de carcinogenicidade do mesmo, reduzindo-se assim o número total de animais utilizados. Podem também prever-se grupos satélites na etapa de toxicidade crónica do estudo, para verificar a reversibilidade de alterações toxicológicas induzidas pelo produto químico em estudo. Nesse caso, os grupos satélite podem restringir-se à dose mais elevada em estudo e aos grupos de controlo. Pode prever-se um grupo de animais sentinelas (habitualmente cinco animais de cada sexo) para verificar, se necessário, o aparecimento de doenças durante o estudo (30). O documento de orientações n.º 116 (7) contém mais informações sobre a maneira de, minimizando o número total de animais utilizados, incluir no estudo eutanásias intercalares e animais satélites e sentinelas.

21. Caso esteja prevista no estudo a existência de animais satélites e/ou a realização de eutanásias intercalares, o número de animais a utilizar com essas finalidades em cada grupo de dose é normalmente de dez de cada sexo. Nesse caso, o número total de animais utilizado no estudo deve ser aumentado no número de animais a eutanasiar antes da conclusão do mesmo. Normalmente, os animais satélites e os animais sujeitos à eutanásia intercalar devem ser objeto do mesmo exame, nomeadamente peso corporal, consumo de alimentos e de água, análises hematológicas e de bioquímica clínica e exames patológicos, que os animais participantes na etapa de toxicidade crónica do estudo principal, embora também possa prever-se (no caso dos grupos com destino a eutanásia intercalar) que as determinações se limitem a parâmetros fundamentais específicos, por exemplo, de neurotoxicidade ou de imunotoxicidade.

Grupos de dose e dosagens

22. O documento de orientações n.º 116 (7) contém orientações relativas a todos os aspetos relacionados com a escolha das doses e os intervalos entre estas. Devem ser utilizados pelo menos três doses e um controlo em paralelo, para as etapas de toxicidade crónica e de carcinogenicidade. As doses baseiam-se, normalmente, nos resultados de estudos exploratórios das doses ou de estudos de dose repetida por períodos mais curtos e devem atender aos dados toxicológicos e toxicocinéticos disponíveis sobre o produto químico em estudo ou produtos químicos afins.

▼M4

23. Se for de prever que o ensaio, na etapa de toxicidade crónica do estudo, de uma dose não inferior a 1 000 mg/kg de peso corporal/dia não provoque efeitos adversos, pode considerar-se que não é necessário efetuar um estudo completo com três doses. Esta decisão deve basear-se nos resultados de estudos preliminares e, tendo em conta dados referentes a produtos químicos estruturalmente afins, na provável ausência de efeitos tóxicos. Nesses casos, pode justificar-se um limite de 1 000 mg/kg de peso corporal/dia, exceto se os dados relativos à exposição humana aconselharem o ensaio de uma dose superior.

24. A menos que tal dose esteja limitada pelas características físico-químicas ou pelos efeitos biológicos do produto químico em estudo, deve escolher-se para dose mais elevada o nível que permita identificar os principais órgãos afetados e os efeitos tóxicos principais sem causar sofrimento, efeitos tóxicos intensos, morbidez nem mortalidade. Normalmente, escolhe-se para dose mais elevada uma dose que induza efeitos tóxicos, evidenciados, por exemplo, por uma redução (aproximadamente de 10 %) do ganho de peso corporal. Todavia, consoante os objetivos do estudo (ver o ponto 6), pode escolher-se uma dose máxima inferior à que evidencia efeitos tóxicos, por exemplo, se essa dose induzir um efeito adverso preocupante, mas com pouca influência na longevidade ou no peso corporal dos animais.

25. Podem escolher-se doses e intervalos entre doses que permitam estabelecer uma relação dose-resposta e, consoante o modo de ação do produto químico em estudo, determinar um NOAEL ou outro resultado pretendido do estudo, por exemplo, uma dose de referência (ver o ponto 27). Entre os fatores a ter em conta na escolha das doses mais baixas, contam-se o declive esperado da curva dose-resposta, as doses às quais podem ocorrer alterações importantes ao nível metabólico ou do modo da ação tóxica, o nível ao qual se prevê a ocorrência de um limiar e o nível ao qual se prevê fixar o ponto de partida de extrapolações para doses mais baixas. O objetivo principal de um estudo combinado de carcinogenicidade e de toxicidade crónica é obter informações destinadas à avaliação do risco de carcinogenicidade, sendo a recolha de dados relativos à toxicidade crónica um objetivo normalmente secundário. É importante ter isto presente ao escolher as doses e os intervalos entre doses para o estudo a realizar.

26. O intervalo entre as doses depende dos objetivos do estudo e das características do produto químico em estudo e não pode ser particularizado neste método. Contudo, a utilização de intervalos definidos por um fator de 2 a de 4 entre doses consecutivas dá frequentemente bons resultados nestes ensaios, sendo muitas vezes melhor ensaiar um quarto grupo do que recorrer a intervalos muito grandes (por exemplo, mais do que um fator de 6 a 10) entre as dosagens. Em geral, são de evitar fatores superiores a 10. Caso contrário, é necessário justificá-los.

27. Conforme se explica mais em pormenor no documento de orientações n.º 116 (7), entre os aspetos a ter em conta na escolha das doses contam-se os seguintes:

— relações não lineares ou pontos de inflexão conhecidos ou de que se suspeite na curva dose-resposta,

— aspetos toxicocinéticos e doses às quais ocorra, ou não ocorra, indução metabólica, saturação ou não linearidade entre as doses externas e as doses internas,

— lesões precursoras, marcadores de efeitos ou indicadores de processos biológicos fundamentais subjacentes em curso,

▼M4

— aspetos fundamentais (ou de que se suspeite) do modo de ação, tais como as doses às quais começam a manifestar-se efeitos citotóxicos, os níveis hormonais são perturbados, os mecanismos homeostáticos colapsam, etc.,

— regiões da curva dose-resposta que necessitam de estimativas especialmente rigorosas, por exemplo, perto da dose de referência prevista ou da dose à qual se suspeite corresponder um limiar,

— níveis previstos de exposição humana, sobretudo na escolha das doses baixas e intermédias.

28. O grupo de controlo deve ser um grupo não exposto ao produto químico em estudo ou, se for usado um veículo para administrar o produto químico, um grupo de controlo do veículo. Salvo no que respeita à exposição ao produto químico em estudo, os animais do grupo de controlo devem ser tratados do mesmo modo que os animais dos grupos ensaiados. Caso se utilize um veículo, o grupo de controlo deve receber o volume máximo de veículo utilizado nos grupos expostos ao produto químico em estudo. Se o produto químico for administrado por via da dieta e reduzir significativamente a quantidade desta ingerida por lhe conferir menor palatabilidade, um grupo de controlo adicional alimentado do mesmo modo, em paralelo, pode constituir um grupo de controlo mais adaptado.

Preparação das doses e administração do produto químico em estudo

29. O produto químico em estudo é normalmente administrado por via oral, através da dieta ou da água de beber ou por intermédio de uma sonda esofágica. O documento de orientações n.º 116 (7) contém mais informações sobre vias e métodos de administração. A via e o método de administração dependem do objetivo do estudo, bem como das propriedades físico-químicas e biodisponibilidade do produto químico em causa e da via e do método de exposição humana predominantes. É necessário fundamentar a via e o método de administração escolhidos. Por razões de bem-estar animal, normalmente só deve optar-se pela utilização de uma sonda esofágica no caso dos agentes relativamente aos quais a via oral e este método de administração representem razoavelmente a exposição humana potencial (por exemplo, através da ingestão de produtos farmacêuticos). No caso dos produtos químicos ingeridos com os alimentos ou disseminados no ambiente, nomeadamente pesticidas, a administração habitual é por incorporação na dieta ou na água de beber. Todavia, para outros cenários – caso da exposição profissional –, pode justificar-se a administração por outras vias.

30. Se necessário, pode suspender-se ou dissolver-se o produto químico em estudo num veículo apropriado. Devem ser tidos em conta as seguintes características que se justifiquem do veículo e de outros aditivos: efeitos na absorção, na distribuição, no metabolismo ou na retenção do produto químico em causa, efeitos nas propriedades químicas do produto químico em estudo suscetíveis de alterarem as características tóxicas do mesmo e efeitos no consumo de alimentos, na ingestão de água ou no estado nutricional dos animais. Recomenda-se que, sempre que possível, a primeira opção seja uma solução ou suspensão aquosa; caso tal não seja viável, pode optar-se por uma solução ou emulsão num óleo (por exemplo, em óleo de milho); em último caso, poderá recorrer-se a uma solução noutro veículo. Se o veículo utilizado não for água, é necessário conhecer as suas características de toxicidade. Deve dispor-se de informações sobre a estabilidade do produto químico em estudo e a homogeneidade das soluções ou rações de dosagem (consoante o caso) nas condições de administração (por exemplo, por via da dieta).

31. É importante assegurar que a quantidade de um produto químico em estudo administrada através da dieta ou da água de beber não interfere nas exigências normais de nutrição nem no equilíbrio hídrico. No caso dos estudos de toxicidade a longo prazo nos quais o produto químico seja administrado pela via alimentar, a concentração deste nos alimentos não deve, normalmente, exceder 5 % da ração total, a fim de evitar desequilíbrios nutricionais. Se o produto químico em estudo for administrado por via da dieta, pode optar-se por concentrações constantes nesta (mg/kg de alimentos ou ppm) ou por doses constantes em relação ao peso corporal do animal (mg/kg de peso corporal), calculadas semanalmente. Deve indicar-se a opção tomada.

▼M4

32. Em caso de administração por via oral, os animais recebem uma dose quotidiana (sete dias por semana) do produto químico em estudo, ao longo de 12 meses (na etapa de toxicidade crónica) ou de 24 meses (na etapa de carcinogenicidade) — ver também os pontos 33 e 34. É necessário justificar qualquer outro regime de dosagem (por exemplo, cinco dias por semana). Em caso de administração por via dérmica, os animais são normalmente expostos ao produto químico em estudo durante, pelo menos, seis horas por dia, sete dias por semana, conforme se descreve no capítulo B.9 (11) deste anexo, ao longo de 12 meses (na etapa de toxicidade crónica) ou de 24 meses (na etapa de carcinogenicidade). A exposição por via inalatória é efetuada durante seis horas por dia, sete dias por semana. Todavia, caso se justifique, também podem expor-se os animais durantecinco dias por semana. O período de exposição neste caso é normalmente de 12 meses (na etapa de toxicidade crónica) ou de 24 meses (na etapa de carcinogenicidade). Se espécies que não o rato forem sujeitas a exposição unicamente nasal, pode ajustar-se a duração máxima da exposição para minimizar a tensão gerada na espécie em causa. Se a duração da exposição for inferior a seis horas por dia, é necessário fundamentá-lo. Ver também o capítulo B.8 (9) deste anexo.

33. A administração do produto químico aos animais por meio de uma sonda esofágica deve efetuar-se à mesma hora do dia por meio de um tubo estomacal ou de uma cânula de intubação adequada. Normalmente, administra-se a dose diária de uma só vez. Porém, se o produto químico for, por exemplo, um irritante local, pode repartir-se a mesma dose diária por dois momentos. O volume máximo de líquido que pode ser administrado de cada vez depende do tamanho do animal e deve ser o mínimo possível. No caso dos roedores, normalmente não deve exceder 1 ml/100 g de peso corporal (31). Para minimizar diferenças entre volumes administrados, devem ser efetuados ajustes nas concentrações, de forma que o volume seja o mesmo para todas as doses. Excetuam-se os produtos químicos potencialmente corrosivos ou irritantes, que têm de ser diluídos para evitar efeitos locais intensos. Devem evitar-se concentrações que possam provocar efeitos corrosivos ou irritantes no tubo digestivo.

Duração do estudo

34. Embora o período de exposição e a etapa de toxicidade crónica deste estudo se prolonguem, normalmente, por 12 meses, este método também está adaptado e pode aplicar-se a estudos mais curtos (por exemplo, seis ou nove meses) ou mais longos (por exemplo, 18 ou 24 meses), consoante o exija a regulamentação pertinente ou por razões mecanísticas determinadas. Se o período de exposição não for de 12 meses, é necessário fundamentá-lo, sobretudo se a duração da exposição for mais curta. A exposição de todos os grupos que participam nesta etapa termina no momento previsto para as avaliações de toxicidade crónica e de patologias não neoplásicas. Os grupos satélites incluídos para verificar a reversibilidade de alterações toxicológicas induzidas pelo produto químico em estudo devem manter-se sem dosagem após o termo da exposição, durante um período não inferior a quatro semanas e não superior a um terço da duração total do estudo.

35. No caso dos roedores, a duração da etapa de carcinogenicidade deste estudo é normalmente de 24 meses, o que representa grande parte do tempo de vida dos animais utilizados. Consoante o tempo de vida dos animais da estirpe de espécie utilizada no estudo, este pode ser mais curto ou mais longo, mas é necessário justificá-lo. No caso de determinadas estirpes de ratinhos (por exemplo, AKR/J, C3H/J ou C57BL/6J), pode ser adequada uma duração do estudo de 18 meses. Seguem-se algumas orientações sobre a duração do estudo, o termo deste e a sobrevivência. Para mais orientações, nomeadamente no que respeita aos critérios para considerar a carcinogenicidade negativa com base na sobrevivência dos animais estudados, consultar o documento de orientações n.º 116.

▼M4

— deve ponderar-se pôr termo ao estudo quando o número de sobreviventes do grupo exposto à dose mais baixa ou do grupo de controlo descer abaixo de 25 %.

— se apenas morrerem prematuramente devido a efeitos tóxicos animais do grupo exposto à dose mais elevada, não deve pôr-se termo ao estudo.

— a sobrevivência dos animais deve ser examinada separadamente para cada sexo.

— o estudo não deve prolongar-se além do estádio em que os dados dele extraíveis deixam de ser suficientes para validar uma avaliação estatística.

EXAMES (ETAPA DE TOXICIDADE CRÓNICA)

36. Normalmente no início e no final de cada dia, incluindo fins de semana e feriados, deve verificar-se os casos de morbidez ou mortalidade no conjunto dos animais. Pelo menos uma vez por dia, deve efetuar-se um exame clínico geral, de preferência sempre à(s) mesma(s) hora(s) e, no caso da administração por sonda esofágica, tendo em conta o período previsto de efeitos mais acentuados após a administração do produto químico.

37. Deve efetuar-se um exame clínico aprofundado a cada animal pelo menos uma vez antes da primeira exposição (para poder fazer depois comparações com o estado inicial do animal), no final da primeira semana do estudo e, a partir daí, mensalmente. Os exames devem respeitar um protocolo que minimize as variações entre quem os realiza e não faça depender os resultados do grupo examinado. Estes exames devem ser realizados fora das gaiolas, de preferência num recinto normalizado e sempre à mesma hora. Os resultados destes exames devem ser cuidadosamente registados, de preferência por recurso a um sistema de pontuação claramente definido pelo laboratório em causa. Deve zelar-se por que as condições de exame sejam o mais constantes possível. Entre os sinais a registar contam-se alterações da pele, da pelagem, dos olhos e das mucosas e a ocorrência de secreções, excreções ou reações neurovegetativas (por exemplo, lacrimação, horripilação, alterações da dimensão pupilar ou respiração anormal). Deve também registar-se qualquer alteração da maneira de o animal se mover, da postura e da reação à manipulação, bem como a ocorrência de movimentos clónicos ou tónicos e de comportamentos estereotipados (por exemplo, atos de higiene repetitivos ou movimentação repetitiva em círculo) ou estranhos (automutilação, movimentação para trás, etc.) (32).

38. Recorrendo a um oftalmoscópio ou a dispositivo equivalente, efetua-se um exame oftalmológico a cada animal antes da primeira administração do produto químico em estudo. No termo do estudo, deve efetuar-se este exame de preferência a todos os animais, mas pelo menos aos dos grupos expostos à dose mais elevada e dos grupos de controlo. Se forem detetadas alterações oculares atribuíveis à exposição ao produto químico em estudo, devem examinar-se todos os animais. Se a análise estrutural ou outros elementos indiciarem efeitos tóxicos ao nível ocular, deve aumentar-se a frequência dos exames oculares.

39. No caso dos produtos químicos que tenham revelado potencial de indução de efeitos neurotóxicos em estudos anteriores de toxicidade por dose repetida a 28 dias e/ou a 90 dias, poderá, a título facultativo, verificar-se a reatividade sensorial a diversos tipos de estímulos (32) — por exemplo, estímulos auditivos, visuais ou propriocetivos (33)(34)(35) — e avaliar-se a força de preensão (36) e a atividade motora (37), antes de iniciar o estudo e, a partir daí, de três em três meses, até aos doze meses, inclusive, bem como no termo do estudo (se for além de doze meses). As referências indicadas contêm mais informações sobre a maneira de proceder em cada caso, embora possam adotar-se procedimentos distintos dos nelas descritos.

▼M4

40. No caso dos produtos químicos que tenham revelado potencial de indução de efeitos imunotóxicos em estudos anteriores de toxicidade por dose repetida a 28 dias e/ou a 90 dias, poderá, a título facultativo, aprofundar-se a investigação deste parâmetro no termo do estudo.

Peso corporal, consumo de alimentos e de água, eficiência alimentar

41. Todos os animais devem ser pesados no início da exposição, pelo menos uma vez por semana nas primeiras treze semanas e, a partir daí, pelo menos uma vez por mês. Deve medir-se o consumo de alimentos e a eficiência alimentar pelo menos uma vez por semana nas primeiras treze semanas e, a partir daí, pelo menos uma vez por mês. Se o produto químico em estudo for administrado através da água de beber, deve medir-se o consumo de água pelo menos uma vez por semana nas primeiras treze semanas e, a partir daí, pelo menos uma vez por mês. Pode ser útil medir o consumo de água também no caso dos estudos em que se verifiquem alterações do comportamento dos animais a esse nível.

Análises hematológicas e de bioquímica clínica

42. Nos estudos com roedores, devem ser efetuadas análises hematológicas a todos os animais estudados (dez machos e dez fêmeas de cada grupo) aos três, seis e 12 meses e no termo do estudo (se for além de 12 meses). No caso dos ratinhos, a realização das análises hematológicas necessárias pode exigir o recurso a animais satélites (ver o ponto 19). No caso dos estudos em que não sejam utilizados roedores, colhem-se amostras num número mais reduzido de animais (por exemplo, se a espécie utilizada for o cão, quatro animais de cada sexo, por grupo) em estádios intermédios e no termo do estudo, tal como se indicou para os roedores. Se, num estudo anterior, a 90 dias, efetuado com doses comparáveis, não se tiverem detetado alterações dos parâmetros hematológicos, não é necessário efetuar as análises previstas ao fim de três meses, tanto no caso dos roedores como de outras espécies. As amostras de sangue devem ser colhidas, sob anestesia, num ponto determinado a indicar, por exemplo, por punção cardíaca ou no seio retro-orbital.

43. Devem ser efetuadas as seguintes análises (38): contagem total de leucócitos, fórmula leucocitária, contagem de eritrócitos, contagem de plaquetas, concentração de hemoglobina, hematócrito (volume celular sanguíneo após centrifugação), volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média, concentração de hemoglobina corpuscular média, tempo de protrombina e tempo de tromboplastina parcial ativada. Se necessário, em função da toxicidade do produto químico em estudo, poderão analisar-se outros parâmetros hematológicos, tais como os corpos de Heinz e outras anomalias morfológicas dos eritrócitos ou a meta-hemoglobina. Em termos gerais, deve adotar-se uma perspetiva de flexibilidade, dependendo dos efeitos observados e/ou previstos do produto químico em causa. Se este tiver efeitos no sistema hematopoiético, pode ser útil efetuar também a contagem de reticulócitos e uma citologia da medula óssea, embora estas análises não sejam sistematicamente necessárias.

44. Com a mesma cronologia especificada para as análises hematológicas, Devem ser efetuadas análises de bioquímica clínica a amostras de sangue colhidas em todos os animais estudados (dez machos e dez fêmeas de cada grupo), para determinar os principais efeitos tóxicos nos tecidos, nomeadamente ao nível dos rins e do fígado. No caso dos ratinhos, a realização das necessárias análises de bioquímica clínica pode exigir o recurso a animais satélites. No caso dos estudos em que não sejam utilizados roedores, colhem-se amostras num número mais reduzido de animais (por exemplo, se a espécie utilizada for o cão, quatro animais de cada sexo, por grupo) em estádios intermédios e no termo do estudo, tal como se indicou para os roedores. Se, num estudo anterior, a 90 dias, efetuado com doses

▼M4

comparáveis, não se tiverem detetado alterações dos parâmetros de bioquímica clínica, não é necessário efetuar as análises previstas ao fim de três meses, tanto no caso dos roedores como de outras espécies. Recomenda-se o jejum dos animais (exceto dos ratinhos) durante a noite, antes da colheita das amostras de sangue ([1]). Devem ser efetuadas as seguintes análises (38): glucose, ureia (azoto ureico), creatinina, proteínas totais, albumina, cálcio, sódio, potássio, colesterol total, pelo menos duas análises reveladoras de efeitos hepatocelulares (alanina-aminotransferase, aspartato-aminotransferase, glutamate-desidrogenase, ácidos biliares totais) (39) e, pelo menos, duas análises reveladoras de efeitos hepatobiliares (fosfatase alcalina, gama-glutamil-transferase, 5'-nucleotidase, bilirrubina total, ácidos biliares totais) (39). Se necessário, em função da toxicidade do produto químico em estudo, poderão analisar-se outros parâmetros de química clínica, tais como a colinesterase, hormonas específicas e os triglicéridos em jejum. Em termos gerais, deve adotar-se uma perspetiva de flexibilidade, dependendo dos efeitos observados e/ou previstos do produto químico em causa.

45. Devem ser efetuadas análises de urina a todos os animais estudados (dez machos e dez fêmeas de cada grupo), em amostras colhidas com a mesma cronologia especificada para as análises hematológicas e de química clínica. Se, num estudo anterior, a 90 dias, efetuado com doses comparáveis, não se tiverem detetado alterações dos parâmetros analisados na urina, não é necessário efetuar as análises previstas ao fim de três meses. Uma recomendação de peritos relativa a estudos de patologia clínica (38) inclui a seguinte lista de parâmetros: aspeto, volume, osmolalidade ou densidade, pH, proteínas totais e glucose. Podem também determinar-se os seguintes parâmetros: corpos cetónicos, urobilinogénio, bilirrubina e sangue oculto. Pode ser necessário recorrer ainda a outros parâmetros para investigar melhor os efeitos observados.

46. Em geral, considera-se que, nos estudos em cães, é necessário determinar os valores de base dos parâmetros hematológicos e de bioquímica clínica antes de iniciar a exposição dos animais, o mesmo não sucedendo, porém, no caso dos estudos em roedores (38). Se os dados de base históricos (ver o ponto 58) forem inadequados, pode, no entanto, ser necessário determinar os dados em falta.

PATOLOGIA

Autópsia macroscópica

47. Normalmente, deve ser realizada a todos os animais estudados uma autópsia macroscópica completa e pormenorizada através do exame cuidadoso da superfície exterior do corpo, dos orifícios, das cavidades craniana, torácica e abdominal e do conteúdo de cada uma destas. Todavia, pode igualmente prever-se que (no caso dos grupos com destino a eutanásia intercalar e dos grupos satélites) as determinações se limitem a parâmetros fundamentais específicos, por exemplo, de neurotoxicidade ou de imunotoxicidade (ver o ponto 21). Não é necessário autopsiar esses animais nem aplicar-lhes os procedimentos descritos nos pontos seguintes. Fica ao critério do diretor do estudo decidir em que casos é necessário autopsiar animais sentinelas.

([1]) No caso de algumas determinações no soro e no plasma, nomeadamente da glucose, é aconselhável que os animais jejuem durante a noite. O principal motivo deste recomendação reside no facto de que a maior variabilidade dos resultados que inevitavelmente ocorreria se os animais não jejuassem poderia ocultar efeitos subtis e dificultar as interpretações. No entanto, por outro lado, o jejum durante a noite pode interferir no metabolismo geral dos animais, e, particularmente nos estudos realizados com administração pela via alimentar, perturbar a exposição diária ao produto químico em estudo. Os animais devem ser todos avaliados no mesmo estado fisiológico, pelo que é preferível programar as avaliações pormenorizadas e as avaliações neurológicas para um dia diferente do da colheita das amostras para as análises de bioquímica clínica.

▼M4

48. Deve determinar-se o peso dos órgãos de cada animal, com exceção dos excluídos no ponto 47. Removem-se convenientemente os tecidos aderentes às glândulas suprarrenais, ao encéfalo, aos epidídimos, ao coração, aos rins, ao fígado, aos ovários, ao baço, aos testículos, à tiroide (com as glândulas paratiroides, sendo a pesagem efetuada depois da fixação) e ao útero de todos os animais (exceto os moribundos e/ou os que sejam eutanasiados durante o estudo) e pesa-se cada um destes ainda húmido o mais rapidamente possível depois da dissecação, para evitar que seque.

49. Os tecidos a seguir indicados devem conservar-se no meio de fixação mais adequado ao tipo de tecido em causa e ao exame histopatológico previsto (40) – os tecidos entre parênteses retos são facultativos:

todas as lesões macroscópicas	coração	pâncreas	estômago (pré-estômago, estômago glandular)
glândulas suprarrenais	íleo	glândulas paratiroides	[dentes]
aorta	jejuno	nervo periférico	testículos
encéfalo (incluindo secções dos hemisférios cerebrais, do cerebelo e da medula/protuberância anelar)	rins	hipófise	timo
cego	glândulas lacrimais (exo-orbitais)	próstata	tiroide
colo do útero	fígado	reto	[língua]
glândulas de coagulação	pulmões	glândulas salivares	traqueia
cólon	gânglios linfáticos (superficiais e profundos)	vesículas seminais	bexiga urinária
duodeno	glândulas mamárias (obrigatório no caso das fêmeas e, nos machos, se for claramente dissecável)	músculo esquelético	útero, incluindo o colo do útero
epidídimo	[vias respiratórias superiores, incluindo o nariz, os cornetos e os seios paranasais]	pele	[ureteres]
olhos (incluindo a retina)	esófago	medula espinal (a três níveis: cervical, mediotorácico e lombar)	[uretra]
[fémur com articulação]	[bolbo olfativo]	baço	vagina
vesícula biliar (exceto no caso do rato)	ovários	[esterno]	secção da medula óssea e/ /ou uma punção recente de medula óssea
glândulas de Harder			

▼M4

No caso dos órgãos emparelhados (por exemplo, os rins e as glândulas suprarrenais), devem ser ambos conservados. Os resultados clínicos ou outros podem aconselhar o exame de outros tecidos. Devem ser conservados também todos os órgãos que as propriedades conhecidas do produto químico em estudo indiciem que serão provavelmente afetados. Nos estudos por via dérmica, os órgãos a examinar são ainda os constantes da lista relativa à exposição por via oral, mas é necessário proceder igualmente à amostragem e à conservação de pele do local onde o produto químico em estudo foi aplicado. Nos estudos por inalação, a lista de tecidos do aparelho respiratório a conservar e a examinar deve seguir as recomendações dos capítulos B.8 (9) e B.29 (10) deste anexo. A lista de outros órgãos e tecidos a examinar neste caso (além dos tecidos do aparelho respiratório a conservar já especificados) é a estabelecida para a exposição por via oral.

Histopatologia

50. A referência 40 contém orientações sobre as melhores práticas a seguir na realização de estudos de patologias toxicológicas. Os exames histopatológicos devem incidir, no mínimo, no seguinte:

— todos os tecidos dos animais dos grupos de controlo e dos grupos expostos à dose mais elevada,

— todos os tecidos dos animais que morreram ou foram eutanasiados durante o estudo,

— todos os tecidos com anomalias macroscópicas,

— os tecidos dos órgãos afetados, e os tecidos que revelaram alterações atribuíveis à exposição ao produto químico em estudo nos animais dos grupos expostos à dose mais elevada, de todos os animais de todos os outros grupos expostos a uma dose do produto químico,

— no caso dos órgãos emparelhados (por exemplo, os rins e as glândulas suprarrenais), devem examinar-se ambos.

EXAMES (ETAPA DE CARCINOGENICIDADE)

51. Normalmente no início e no final de cada dia, incluindo fins de semana e feriados, devem verificar-se os casos de morbidez ou mortalidade no conjunto dos animais. Verifica-se igualmente, uma vez por dia, se os animais têm sinais com importância toxicológica. No caso dos estudos que recorrem à administração por sonda esofágica, os animais devem ser verificados imediatamente após a administração do produto químico. Deve prestar-se especial atenção ao desenvolvimento de tumores, registando-se o tempo decorrido até ao aparecimento destes e o local, as dimensões, o aspeto e a progressão de cada tumor visível na observação macroscópica ou identificável por palpação.

52. Todos os animais devem ser pesados no início da exposição, pelo menos uma vez por semana nas primeiras treze semanas e, a partir daí, pelo menos uma vez por mês. Deve medir-se o consumo de alimentos e a eficiência alimentar pelo menos uma vez por semana nas primeiras treze semanas e, a partir daí, pelo menos uma vez por mês. Se o produto químico em estudo for administrado através da água de beber, deve medir-se o consumo de água pelo menos uma vez por semana nas primeiras treze semanas e, a partir daí, pelo menos uma vez por mês. Pode ser útil medir o consumo de água também no caso dos estudos em que se verifiquem alterações do comportamento dos animais a esse nível.

▼M4

Análises hematológicas e de bioquímica clínica e outras determinações

53. A fim de extrair um máximo de informações do estudo, sobretudo no que respeita ao modo de ação, fica ao critério do diretor do estudo proceder à colheita de amostras de sangue para análises hematológicas e de bioquímica clínica. Pode também ser útil efetuar análises de urina. Os dados relativos aos animais utilizados na etapa de toxicidade crónica do estudo — a qual normalmente tem a duração de doze meses (ponto 34) — fornecem informações sobre os parâmetros destas análises. Para mais orientações sobre o interesse da colheita das referidas amostras num estudo de carcinogenicidade, consultar o documento de orientações n.º 116 (7). Se forem colhidas amostras de sangue com essa finalidade, deve efetuar-se a colheita no final do período de ensaio, imediatamente antes da eutanásia dos animais ou integrada nesta. As amostras devem ser colhidas, sob anestesia, num ponto determinado a indicar, por exemplo, por punção cardíaca ou no seio retro-orbital. Podem igualmente preparar-se esfregaços de sangue para exame, em especial se o órgão afetado for a medula óssea. Todavia, tem sido questionada (38) a utilidade deste exame de esfregaços de sangue na etapa de carcinogenicidade para a avaliação do potencial cancerígeno/ /oncogénico.

PATOLOGIA

Autópsia macroscópica

54. Deve ser realizada a todos os animais estudados — exceto os animais sentinelas e outros animais satélites (ver o ponto 20) — uma autópsia macroscópica completa e pormenorizada através do exame cuidadoso da superfície exterior do corpo, dos orifícios, das cavidades craniana, torácica e abdominal e do conteúdo de cada uma destas. Fica ao critério do diretor do estudo decidir em que casos é necessário autopsiar animais sentinelas ou outros animais satélites. A pesagem de órgãos normalmente não faz parte dos estudos de carcinogénese, dado que as alterações geriátricas e o desenvolvimento de tumores em fases avançadas diminuem a utilidade dessas pesagens. Todavia, estas pesagens podem ter muita importância nas avaliações baseadas na suficiência da prova, sobretudo no que respeita ao modo de ação. Se fizerem parte de estudos satélites, deve recolher-se estes dados o mais tardar um ano após o início do estudo.

55. Os tecidos a seguir indicados devem conservar-se no meio de fixação mais adequado ao tipo de tecido em causa e ao exame histopatológico previsto (40) — os tecidos entre parênteses retos são facultativos:

todas as lesões macroscópicas	coração	pâncreas	estômago (pré-estômago, estômago glandular)
glândulas suprarrenais	íleo	glândulas paratiroides	[dentes]
aorta	jejuno	nervo periférico	testículos
encéfalo (incluindo secções dos hemisférios cerebrais, do cerebelo e da medula/protuberância anelar)	rins	hipófise	timo
cego	glândulas lacrimais (exo-orbitais)	próstata	tiroide
colo do útero	fígado	reto	[língua]
glândulas de coagulação	pulmões	glândulas salivares	traqueia
cólon	gânglios linfáticos (superficiais e profundos)	vesículas seminais	bexiga urinária

▼M4

duodeno	glândulas mamárias (obrigatório no caso das fêmeas e, nos machos, se for claramente dissecável)	músculo esquelético	útero, incluindo o colo do útero
epidídimo	[vias respiratórias superiores, incluindo o nariz, os cornetos e os seios paranasais]	pele	[ureteres]
olhos (incluindo a retina)	esófago	medula espinal (a três níveis: cervical, mediotorácico e lombar)	[uretra]
[fémur com articulação]	[bolbo olfativo]	baço	vagina
vesícula biliar (exceto no caso do rato)	ovários	[esterno]	secção da medula óssea e/ /ou uma punção recente de medula óssea
glândulas de Harder			

No caso dos órgãos emparelhados (por exemplo, os rins e as glândulas suprarrenais), devem conservar-se ambos. Os resultados clínicos ou outros podem aconselhar o exame de outros tecidos. Devem conservar-se também todos os órgãos que as propriedades conhecidas do produto químico em estudo indiciem que serão provavelmente afetados. Nos estudos por via dérmica, os órgãos a examinar são ainda os constantes da lista relativa à exposição por via oral, mas é necessário proceder igualmente à amostragem e à conservação de pele do local onde o produto químico em estudo foi aplicado. Nos estudos por inalação, a lista de tecidos do aparelho respiratório a conservar e a examinar deve seguir as recomendações dos capítulos B.8 (8) e B.29 (9) deste anexo. A lista de outros órgãos e tecidos a examinar neste caso (além dos tecidos do aparelho respiratório a conservar já especificados) é a estabelecida para a exposição por via oral.

Histopatologia

56. A referência 40 contém orientações sobre as melhores práticas a seguir na realização de estudos de patologias toxicológicas. Os exames devem incidir, no mínimo, nos seguintes tecidos:

— todos os tecidos dos animais dos grupos de controlo e dos grupos expostos à dose mais elevada,

— todos os tecidos dos animais que morreram ou foram eutanasiados durante o estudo,

— todos os tecidos com anomalias macroscópicas, incluindo tumores,

— os tecidos que revelaram alterações histopatológicas atribuíveis à exposição ao produto químico em estudo nos animais dos grupos expostos à dose mais elevada, de todos os animais de todos os outros grupos expostos a uma dose do produto químico,

— no caso dos órgãos emparelhados (por exemplo, os rins e as glândulas suprarrenais), devem examinar-se ambos.

▼M4

DADOS E RELATÓRIOS (TOXICIDADE CRÓNICA E CARCINOGENICIDADE)

Dados

57. Deve apresentar-se os dados por animal relativos a todos os parâmetros avaliados. Esses dados devem ainda ser resumidos num quadro, indicando, para cada grupo estudado, o número de animais no início do ensaio, o número de animais que morreram durante o ensaio ou que foram eutanasiados, a hora de cada morte ou eutanásia, o número de animais que apresentaram sinais de toxicidade, a descrição dos sinais de toxicidade observados, nomeadamente o momento do seu aparecimento e a sua duração e intensidade, o número de animais que apresentaram lesões, o tipo de lesões e a percentagem de animais que apresentaram cada tipo de lesão. Devem constar dos quadros de resumo dos dados as médias e os desvios-padrão (no caso dos dados contínuos) correspondentes aos animais que apresentaram lesões ou efeitos tóxicos, além do grau das lesões.

58. Os dados históricos de controlo podem ser úteis para a interpretação dos resultados do estudo, por exemplo, quando houver indicações de que os dados provenientes dos grupos de controlo em paralelo divergem significativamente de dados recentes referentes a animais de controlo da mesma colónia e da mesma unidade de ensaio. Caso sejam avaliados dados históricos de controlo, estes devem provir do mesmo laboratório, reportar-se a animais da mesma idade e estirpe e ter sido gerados nos cinco anos anteriores ao estudo em causa.

59. Quando pertinente, deve avaliar-se os resultados numéricos por um método estatístico corrente adequado. Os métodos estatísticos e os dados a analisar devem ser escolhidos no planeamento do estudo (ponto 9). Nessa escolha, deve prever-se os ajustamentos em função do grau de sobrevivência que se revelem necessários.

60. Dados a constar do relatório dos ensaios:

Produto químico em estudo:

— natureza física, grau de pureza e propriedades físico-químicas,

— dados de identificação,

— proveniência,

— número de lote,

— boletim de análises químicas.

Veículo (se for o caso):

— justificação da escolha do veículo (se não for água).

Animais estudados:

— espécie e estirpe utilizadas e justificação da opção tomada,

— número, idade e sexo dos animais no início dos ensaios,

— proveniência, condições de alojamento, dieta, etc.,

— peso de cada animal no início do ensaio.

▼**M4**

Condições de realização dos ensaios:

— fundamentação da via de administração e das doses escolhidas,

— métodos estatísticos utilizados na análise dos dados, se for o caso,

— elementos relativos à formulação do produto químico em estudo/à incorporação do mesmo na dieta fornecida aos animais,

— dados analíticos relativos à concentração atingida, estabilidade e homogeneidade da preparação,

— via de administração e elementos relativos à administração do produto químico em estudo,

— no caso dos estudos por inalação: exposição unicamente nasal ou de corpo inteiro,

— doses reais (mg/kg de peso corporal/dia) e, se for caso disso, fator de conversão entre a concentração do produto químico em estudo na dieta ou na água de beber (mg/kg ou ppm) e a dose real,

— elementos sobre a qualidade dos alimentos e da água.

Resultados (apresentar quadros de resumo dos dados e os dados por animal):

Informações gerais

— dados de sobrevivência,

— pesos corporais e alterações de peso corporal,

— consumo de alimentos, cálculos da eficiência alimentar (se efetuados) e consumo de água (se for caso disso),

— dados toxicocinéticos, se disponíveis,

— resultados oftalmoscópicos, se disponíveis,

— resultados hematológicos, se disponíveis,

— resultados de química clínica, se disponíveis.

Resultados dos exames clínicos

— sinais de toxicidade,

— incidência (e, se quantificada, intensidade) das anomalias observadas,

— natureza, intensidade e duração dos sinais clínicos observados (reversíveis ou irreversíveis).

Dados das autópsias

— peso corporal terminal,

— peso de cada órgão (e relação com o peso corporal, se for caso disso),

— resultados das autópsias; incidência e intensidade das anomalias.

Histopatologia

— observação de efeitos histopatológicos não neoplásicos,

— observação de efeitos histopatológicos neoplásicos,

▼M4

— correlação entre as observações macroscópicas e os resultados microscópicos,

— descrição pormenorizada dos resultados histopatológicos resultantes da exposição dos animais ao produto químico em estudo, incluindo a classificação de intensidade,

— relatórios do eventual exame das lâminas por pares especialistas.

Tratamento estatístico dos resultados, se for caso disso.

Discussão dos resultados, nomeadamente:

— discussão dos eventuais modelos,

— relações dose-resposta,

— dados históricos de controlo,

— análise dos dados disponíveis sobre modos de ação,

— determinação das doses de referência, do NOAEL e do LOAEL,

— importância para o ser humano.

Conclusões.

REFERÊNCIAS:

(1) OCDE (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Roma, 1995). Documento de trabalho interno. Environment Directorate, OCDE, Paris.

(2) EPA (2005). Guidelines for Carcinogen Risk Assessment. Risk Assessment Forum, U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC.

(3) Combes R.D., Gaunt I., Balls M. (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. *ATLA* 32:163-208.

(4) Barlow S.M., Greig J.B., Bridges J.W. *et al.* (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. *Food. Chem. Toxicol.* 40:145-191.

(5) Chhabra R.S., Bucher J.R., Wolfe M., Portier C. (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 206:437-445.

(6) Capítulo B.27 deste anexo, "Ensaio de toxicidade oral subcrónica — Estudo de toxicidade oral de dose repetida em espécies não roedoras com a duração de 90 dias".

(7) OCDE (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 — segunda edição. Series on Testing and Assessment No. 116. Disponível no sítio *web* público de *Test Guidelines* da OCDE (www.oecd.org/env/testguidelines).

(8) OCDE (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Series on Testing and Assessment No. 39. ENV/JM/MONO(2009)28, OCDE, Paris.

(9) Capítulo B.8 deste anexo, "Toxicidade subaguda por inalação: Estudo de 28 dias".

(10) Capítulo B.29 deste anexo, "Toxicidade subcrónica por inalação: Estudo de 90 dias".

(11) Capítulo B.9 deste anexo, "Toxicidade (dérmica) da dose repetida (28 dias)".

▼**M4**

(12) Boobis A.R., Cohen S.M., Dellarco V., McGregor D., Meek M.E., Vickers C., Willcocks D., Farland W. (2006). IPCS Framework for analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans. *Crit. Rev. in Toxicol.* 36:793-801.

(13) Cohen S.M., Meek M.E., Klaunig J.E., Patton D.E., Fenner-Crisp P.A. (2003). The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: An Overview. *Crit. Rev. Toxicol.* 33:581-589.

(14) Holsapple M.P., Pitot H.C., Cohen S.N., Boobis A.R., Klaunig J.E., Pastoor T., Dellarco V.L., Dragan Y.P. (2006). Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk. *Toxicol. Sci.* 89:51-56.

(15) Meek E.M., Bucher J.R., Cohen S.M., Dellarco V., Hill R.N., Lehman-McKemmon L.D., Longfellow D.G., Pastoor T., Seed J., Patton D.E. (2003). A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action. *Crit. Rev. Toxicol.* 33:591-653.

(16) Carmichael N.G., Barton H.A., Boobis A.R. *et al.* (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. *Crit. Rev. Toxicol.* 36:1-7.

(17) Barton H.A., Pastoor T.P., Baetcke T. *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. *Crit. Rev. Toxicol.* 36:9-35.

(18) Doe J.E., Boobis A.R., Blacker A. *et al.* (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Crit. Rev. Toxicol. 36:37-68.

(19) Cooper R.L., Lamb J.S., Barlow S.M. *et al.* (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. *Crit. Rev. Toxicol.* 36:69-98.

(20) OCDE (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies. Series on Testing and Assessment No. 35; Series on Pesticides No. 14. ENV/JM/MONO(2002)19, OCDE, Paris.

(21) OCDE (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Series on Testing and Assessment No. 19. ENV/JM/MONO(2000)7, OCDE, Paris.

(22) Rhomberg L.R., Baetcke K., Blancato J., Bus J., Cohen S., Conolly R., Dixit R., Doe J., Ekelman K., Fenner-Crisp P., Harvey P., Hattis D., Jacobs A., Jacobson-Kram D., Lewandowski T., Liteplo R., Pelkonen O., Rice J., Somers D., Turturro A., West W., Olin S. (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection. *Crit. Rev. Toxicol.* 37(9):729-837.

(23) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran J.A. (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.

(24) Griffiths S.A., Parkinson C., McAuslane J.A.N., Lumley C.E. (1994). The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals. *The Toxicologist* 14(1):214.

(25) Usui T., Griffiths S.A., Lumley C.E. (1996). The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals. *In* D'Arcy POF & Harron DWG (eds.). Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation. Queen's University Press, Belfast, p. 279-284.

(26) Carmichael N.G., Enzmann H., Pate I., Waechter F. (1997). The Significance of Mouse Liver Tumor Formation for Carcinogenic Risk Assessment: Results and Conclusions from a Survey of Ten Years of Testing by the Agrochemical Industry. *Environ Health Perspect* 105:1196-1203.

▼**M4**

(27) Diretiva 2010/63/UE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 22 de setembro de 2010, relativa à proteção dos animais utilizados para fins científicos (JO L 276 de 20.10.2010, p. 33).

(28) National Research Council (1985). Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington D.C., US. Dept. of Health and Human Services.

(29) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, dezembro de 1989). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-06-9.

(30) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

(31) Diehl K.-H., Hull R., Morton D., Pfister R., Rabemampianina Y., Smith D., Vidal J.-M., van de Vorstenbosch C. (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *Journal of Applied Toxicology* 21:15-23.

(32) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.

(33) Tupper D.E., Wallace R.B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. *Acta Neurobiol. Exp.* 40:999-1003.

(34) Gad S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. *J. Toxicol. Environ. Health* 9:691-704.

(35) Moser V.C., McDaniel K.M., Phillips P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 108:267-283.

(36) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C., Riley M.T. (1979). A Method for the RoutineAssessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice. *Neurobehav. Toxicol.* 1:233-236.

(37) Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. *Neurotoxicol. Teratol.* 13:599-609.

(38) Weingand K., Brown G., Hall R. *et al.* (1996). Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. *Fundam. & Appl. Toxicol.* 29:198-201.

(39) Documento da EMEA (*draft*) "Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity" (Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).

(40) Crissman J.W., Goodman D.G., Hildebrandt P.K. *et al.* (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. *Toxicologic Pathology* 32:126-131.

▼**M4**

Apêndice 1

DEFINIÇÃO

Produto químico em estudo: qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado este método de ensaio.

▼B

B.34. TESTE DE TOXICIDADE SOBRE A REPRODUÇÃO EM UMA GERAÇÃO

1. MÉTODO

1.1. INTRODUÇÃO

Ver Introdução Geral, parte B.

1.2. DEFINIÇÕES

Ver Introdução Geral, parte B.

1.3. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

Nenhuma.

1.4. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

Administra-se a substância a testar em várias doses graduais a vários grupos de animais, machos e fêmeas. Os machos deverão ser tratados durante o crescimento e pelo menos um ciclo espermatogénico completo (cerca de 56 dias no ratinho e 70 dias no rato) de forma a que a substância testada provoque um efeito nocivo eventual na espermatogénese.

As fêmeas da geração progenitora (P) deverão ser tratadas durante pelo menos dois ciclos do estro para permitir que a substância testada provoque alguns efeitos nocivos no estro. Os animais são em seguida acasalados. Administra-se a substância testada aos animais de ambos os sexos durante o período de acasalamento, e depois unicamente às fêmeas durante a gestação e o período de aleitamento. Se se administrar a substância por inalação será necessário modificar-se o método.

1.5. CRITÉRIOS QUALITATIVOS

Nenhum.

1.6. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

Preparativos

Antes do ensaio, os animais adultos jovens e sãos são distribuídos ao acaso pelos grupos tratados e de controlo. Os animais são mantidos nas condições de alojamento e alimentação da experiência pelo menos durante cinco dias antes do início do teste. Recomenda-se a administração da substância a testar na alimentação ou na água de beber. Podem aceitar-se igualmente outras vias de administração. Deve utilizar-se o mesmo método de administração em todos os animais e durante toda a experiência. Se for utilizado um veículo ou outros aditivos para facilitar a administração devem estes ser comprovadamente isentos de efeitos tóxicos. O tratamento deverá ser efectuado durante os sete dias da semana.

▼B

Animais de experiência

Selecção da espécie

As espécies preferidas são o rato ou o ratinho. Devem utilizar-se animais sãos, não sujeitos a experiências anteriores. As estirpes com taxas de fecundidade baixa não deverão ser utilizadas. Serão especificadas a espécie, a estirpe, o sexo, o peso e/ou a idade dos animais de experiência.

Para avaliar a fecundidade de modo adequado deverão ser estudados tanto machos como fêmeas. Todos os animais tratados e de controlo deverão estar desmamados antes do início do tratamento.

Número e sexo

Cada grupo tratado e cada grupo de controlo deve comportar um número de animais suficientes para obter cerca de 20 fêmeas grávidas de termo ou próximas deste.

O objectivo é a obtenção de um número de gestações e de ninhadas suficientes para permitir uma avaliação significativa do efeito da substância sobre a fecundidade, a gestação, o comportamento maternal dos animais da geração P bem como o aleitamento, o crescimento e o desenvolvimento da geração F_1 desde a concepção até ao desmame.

Condições experimentais

A alimentação e a água serão fornecidas *ad libitum*. Quando as fêmeas grávidas estiverem próximas do termo deverão ser colocadas em gaiolas individuais de parto ou de maternidade podendo ser-lhes fornecidos os materiais de nidificação necessários.

Doses

Devem utilizar-se pelo menos três grupos tratados e um grupo de controlo. Se for utilizado um veículo para a administração da substância a testar, o grupo de controlo deverá receber o volume máximo de veículo que tenha sido utilizado. Se uma substância testada causar diminuição da ingestão de alimentos e da sua assimilação, pode tornar-se necessário um grupo de controlo negativo. Nas condições ideais, a não ser que existam limitações devidas à natureza físico-química ou efeitos biológicos da substância testada, a dose máxima deverá produzir um efeito tóxico mas não a morte dos animais progenitores (P). A(s) dose(s) intermédia(s) deverá (deverão) induzir os efeitos tóxicos mínimos atribuíveis à substância a testar e a dose mínima não deverá produzir nenhum efeito nocivo observável nos progenitores ou na sua descendência. Quando a substância for administrada por *gavage* ou cápsula, a dose administrada a cada animal deverá ser calculada em função do peso corporal de cada um e ajustada semanalmente, tendo em conta modificações desse peso. No caso das fêmeas durante a gravidez, as doses podem ser calculadas em função do peso corporal no dia 0 ou 6, se desejado.

Teste limite

No caso de substâncias pouco tóxicas, se uma dose de pelo menos 1 000 mg/kg de peso não provocar nenhuns sinais de interferência com a capacidade de reprodução, podem considerar-se desnecessários estudos com outras doses. Se um estudo preliminar da dose máxima, com toxicidade materna evidente, não mostrar efeitos nocivos na fertilidade, poderão considerar-se desnecessários estudos com outras doses.

▼B

Procedimentos do teste

Plano de experiência

A substância a testar deverá ser administrada diariamente aos machos progenitores (P) assim que atingirem a idade de cinco a nove semanas depois do desmame e de um período de adaptação de, pelo menos, cinco dias. Nos ratos o tratamento é prosseguido durante 10 semanas antes do período de acasalamento (nos ratinhos durante oito semanas). Os machos deverão ser sacrificados e examinados ou no fim do período de acasalamento ou em alternativa mantidos vivos prosseguindo-se com a administração da substância na comida, com vista à produção eventual de uma segunda ninhada, devendo neste caso ser sacrificados e examinados um pouco antes do fim do estudo. No caso das fêmeas (P) o tratamento deverá começar depois de, pelo menos, cinco dias de adaptação e ser prosseguido durante, pelo menos, duas semanas antes do acasalamento. As fêmeas P deverão continuar a receber o seu tratamento diário durante as três semanas do período de acasalamento e gestação até ao desmame dos filhos F_1. Poderão admitir-se modificações do esquema de administração no caso de se disporem de outras informações sobre a substância testada, como a indução do metabolismo ou bioacumulação.

Processo de acasalamento

Nos estudos de toxicidade sobre a reprodução, os acasalamentos poderão ser feitos seja 1:1 (um macho com uma fêmea) seja 1:2 (um macho com duas fêmeas).

No caso de um acasalamento 1:1 deve colocar-se a fêmea sempre com o mesmo macho até ficar grávida ou durante três semanas. Deverão examinar-se as fêmeas todas as manhãs para verificar a presença de esperma ou de rolhão vaginal. O dia 0 da gestação é definido como o dia em que se verifique a presença de rolhão vaginal ou de esperma.

Os casais em que o acasalamento não tiver sucesso devem ser avaliados para determinar as causas da aparente esterilidade.

Isto pode implicar procedimentos como novo acasalamento com animais que já tenham procriado, proceder a um exame microscópico dos órgãos de reprodução ou ao exame do ciclo do estro ou da espermatogénese.

Número de animais por ninhada

Permite-se que os animais usados no estudo de fertilidade dêem à luz normalmente e criem a sua descendência até ao desmame sem homogeneização das ninhadas.

Se se fizer uma homogeneização das ninhadas sugere-se o seguinte método: entre o dia 1 e o dia 4 depois do nascimento, o número de animais por ninhada pode ser ajustado eliminando-se por selecção as crias suplementares a fim de obter, na medida do possível, quatro fêmeas e quatro machos por ninhada.

Se o número de machos e de fêmeas não permitir obter quatro crias de cada sexo por ninhada pode aceitar-se um ajustamento parcial (por exemplo cinco machos e três fêmeas). Não são possíveis ajustamentos nas ninhadas com menos de oito crias.

▼B

Observações

Deve observar-se cada animal pelo menos uma vez por dia durante todo o período do ensaio. Deverão registar-se as modificações de comportamento significativas, sinais de parto difícil ou prolongado, bem como qualquer sinal de toxicidade incluindo a mortalidade. Durante os períodos de pré-acasalamento e acasalamento deve determinar-se diariamente o consumo alimentar. Depois do parto e durante o aleitamento deverá determinar-se o consumo alimentar (e o consumo de água quando o teste da substância for administrado na água para beber) no dia de se pesarem as crias. Os machos e fêmeas progenitores deverão ser pesados no primeiro dia do tratamento e, em seguida, uma vez por semana. Estas observações serão registadas individualmente para cada animal adulto.

Calcula-se a duração da gestação a partir do dia 0 da gravidez. Cada ninhada deverá ser examinada o mais cedo possível, após o parto, para se determinar o número e o sexo das crias, os nado-mortos, os nado-vivos e a presença de anomalias macroscópicas.

As crias mortas e as crias sacrificadas no dia 4 deverão ser conservadas e examinadas para detectar eventuais anomalias. Devem contar-se as crias vivas e pesar as ninhadas na manhã após o nascimento, bem como no 4.º e 7.º dias e, em seguida, semanalmente até ao fim do estudo, sendo os animais nessa altura pesados individualmente.

Deverão ser registadas as alterações físicas ou de comportamento nos progenitores do sexo feminino e na sua descendência.

Patologi*a*

Autópsia

No momento do sacrifício ou da morte, no decurso do estudo, os animais da geração P deverão ser examinados macroscopicamente para se detectar qualquer anomalia estrutural ou alteração patológica, dedicando-se uma atenção especial aos órgãos do aparelho reprodutor. Devem procurar-se eventuais malformações nas crias mortas ou moribundas.

Histopatologia

Devem conservar-se para exame microscópico os ovários, o útero, o colo uterino, a vagina, os testículos, os epidídimos, as vesículas seminais, a próstata, a glândula coagulante, a hipófise e o(s) órgão(s)-alvo de todos os animais P. No caso de estes órgãos não terem sido examinados noutros estudos com doses repetidas, deverão ser feitos exames histológicos a todos os animais do grupo tratados com dose mais elevada, do grupo de controlo e aos animais mortos durante o estudo, quando tal for praticável.

Os órgãos que apresentarem alterações nestes animais serão também examinados em todos os outros animais P. Neste caso deverá efectuar-se um exame microscópico de todos os tecidos que apresentarem alterações patológicas macroscópicas. Como foi já sugerido no procedimento para o acasalamento, os órgãos reprodutores dos animais suspeitos de esterilidade poderão ser submetidos a um exame microscópico.

▼B

2. **RESULTADOS**

Os resultados podem ser resumidos em quadros, indicando para cada grupo experimental o número de animais no início do estudo, o número de machos férteis, o número de fêmeas grávidas, os diversos tipos de alterações, e a percentagem de animais apresentando cada tipo de alteração.

Se possível, os resultados numéricos deverão ser avaliados com um método estatístico apropriado. Pode ser utilizado qualquer método estatístico reconhecido.

3. **RELATÓRIO**

3.1. RELATÓRIO DO TESTE

O relatório do teste deverá também incluir as seguintes informações:

— espécie/estirpe utilizada,

— resposta tóxica por sexo e por dose, incluindo fertilidade, gestação e viabilidade,

— momento da morte no decurso do estudo ou indicação dos animais sobreviventes no fim do estudo,

— quadro apresentando os pesos de cada ninhada, o peso médio das crias e os pesos individuais das crias no fim do estudo,

— efeito tóxico ou outro sobre a reprodução, a descendência e o crescimento pós-natal,

— dia da observação de qualquer manifestação anormal e sua evolução subsequente,

— peso corporal dos animais P,

— resultados da autópsia,

— descrição pormenorizada das observações microscópicas,

— tratamento estatístico dos resultados, se necessário,

— discussão dos resultados,

— interpretação dos resultados.

3.2. AVALIAÇÃO E INTERPRETAÇÃO

Ver Introdução Geral, parte B.

4. **REFERÊNCIAS**

Ver Introdução Geral, parte B.

▼B

B.35. ESTUDO DE TOXICIDADE SOBRE A REPRODUÇÃO EM DUAS GERAÇÕES

1. MÉTODO

O presente método baseia-se na publicação OECD TG 416 (2001) (normas de ensaio da OCDE).

1.1. INTRODUÇÃO

O presente método de ensaio de toxicidade sobre a reprodução em duas gerações destina-se a fornecer informação geral sobre os efeitos de uma substância de ensaio na integridade e no desempenho dos sistemas reprodutores de machos e fêmeas, incluindo a função gonadal, o ciclo do estro, o comportamento de acasalamento, a concepção, a gestação, a parturição, a lactação e o desmame, bem como sobre o crescimento e o desenvolvimento dos descendentes. O estudo pode também dar informações sobre os efeitos da substância de ensaio na morbidade e na mortalidade neonatais e fornecer dados preliminares relativos à toxicidade sobre o desenvolvimento pré-natal e pós-natal, podendo ainda servir de guia para ensaios subsequentes. Além de estudar o crescimento e o desenvolvimento da geração F_1, este método de ensaio destina-se também a avaliar a integridade e o desempenho dos sistemas reprodutores dos machos e fêmeas dessa geração, bem como o crescimento e o desenvolvimento da geração F_2. Caso seja necessário obter informações suplementares relativas à toxicidade sobre o desenvolvimento e às deficiências de desempenho, o presente protocolo pode ser complementado pela introdução de partes de outros estudos descritos em métodos para avaliar a toxicologia sobre o desenvolvimento e/ou a neurotoxicidade sobre o desenvolvimento, conforme o caso; em alternativa, aqueles tópicos podem ser investigados em estudos independentes, com recurso aos métodos de ensaio adequados.

1.2. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

A substância de ensaio é administrada em doses graduais a vários grupos de machos e fêmeas. Os machos da geração P devem ser tratados durante o crescimento e durante pelo menos um ciclo espermatogénico completo (cerca de 56 dias no ratinho e 70 dias no rato), de forma a permitir a detecção de quaisquer efeitos nocivos na espermatogénese. Os efeitos sobre os espermatozóides são determinados por uma série de parâmetros (por exemplo, morfologia e mobilidade) e por exame histopatológico detalhado de preparações de tecidos. Caso tenham sido previamente realizados estudos de dose repetida de duração adequada (por exemplo, um estudo de 90 dias) que forneçam dados sobre a espermatogénese, não será necessário incluir os machos da geração P na avaliação. No entanto, recomenda-se que sejam guardadas amostras ou gravações digitais do esperma da geração P para possibilitar uma avaliação posterior. As fêmeas da geração P devem ser tratadas durante o crescimento e durante vários ciclos estrais completos, para permitir a detecção de quaisquer efeitos adversos causados pela substância de ensaio na normalidade do ciclo do estro. A substância de ensaio é administrada aos animais progenitores (P) durante o acasalamento, durante os períodos de gravidez resultantes e até ao desmame da descendência F_1. Nesta altura, a substância de ensaio passa a ser administrada aos descendentes F_1, que a deverão receber durante o crescimento até à idade adulta, o acasalamento e a produção da geração F_2, até ao desmame da geração F_2.

Todos os animais devem ser objecto de observações clínicas e exames patológicos para se detectarem sinais de toxicidade, devendo dedicar-se atenção especial aos efeitos sobre a integridade e o desempenho dos sistemas reprodutores masculino e feminino, bem como aos efeitos sobre o crescimento e o desenvolvimento da descendência.

▼B

1.3. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.3.1. **Selecção da espécie animal**

A espécie preferida para ensaio é o rato. Caso se utilizem outras espécies, será necessário justificar o seu emprego e introduzir no método de ensaio as modificações apropriadas. Deve evitar-se a utilização de estirpes de fecundidade baixa ou em que se verifique frequentemente uma incidência elevada de deficiências de desenvolvimento. No início do estudo, a diferença de peso entre os animais deverá ser mínima, não podendo ultrapassar 20 % do peso médio de cada sexo.

1.3.2. **Condições de alojamento e alimentação**

A temperatura do compartimento experimental dos animais deve ser de 22 °C (± 3 °C). A humidade relativa deverá ser de 50 %-60 %, embora sejam aceitáveis valores entre um mínimo de 30 % e um máximo que, preferivelmente, não deverá exceder 70 %, salvo durante os períodos de limpeza do compartimento. A iluminação deve ser artificial, com sequências de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão. A alimentação pode basear-se em dietas de laboratório convencionais, com fornecimento ilimitado de água para beber. Quando a substância de ensaio for administrada pela alimentação, a escolha da dieta poderá ser condicionada pela necessidade de assegurar a dosagem adequada.

Os animais podem ser alojados individualmente ou em pequenos grupos do mesmo sexo. O acasalamento deve ocorrer em gaiolas adequadas para o efeito. Quando houver sinais de cópula, as fêmeas acasaladas devem ser colocadas em gaiolas individuais de parto ou de maternidade. Em alternativa, os ratos acasalados podem ser mantidos em grupos pequenos, separando-se apenas um ou dois dias antes do parto. As fêmeas grávidas próximas do termo devem dispor dos materiais de nidificação apropriados e reconhecidos.

1.3.3. **Preparação dos animais**

Devem usar-se animais jovens e saudáveis, que tenham permanecido nas condições experimentais durante pelo menos cinco dias antes do ensaio para aclimatação e que não tenham sido sujeitos a experiências anteriores. Os animais de ensaio devem ser caracterizados no que respeita à espécie, estirpe, proveniência, sexo, peso e/ou idade. Devem conhecer-se as relações de parentesco directo entre os animais, de modo a evitar o acasalamento entre irmãos. Os animais devem ser distribuídos ao acaso pelos grupos de controlo e de tratamento (recomenda-se a estratificação por peso corporal). As gaiolas devem ser dispostas de forma a minimizar possíveis efeitos derivados do seu posicionamento. Cada animal deve receber um número de identificação individualizado. Estes procedimentos devem ser levados a efeito antes do início da dosagem dos animais da geração P e por ocasião do desmame dos animais da geração F_1 seleccionados para acasalamento. Devem manter-se registos da ninhada de origem de todos os animais seleccionados da geração F_1. Quando o ensaio envolve pesagem individual das crias ou quaisquer testes de desempenho, as crias devem ser identificadas individualmente o mais cedo possível depois do nascimento.

No início da dosagem, os animais progenitores (P) devem ter cerca de cinco a nove semanas de idade. Os animais de todos os grupos de ensaio deverão ser, tanto quanto possível, uniformes quanto ao peso e à idade.

▼B

1.4. PROCEDIMENTO

1.4.1. **Número e sexo dos animais**

Cada grupo de ensaio e controlo deve comportar um número de animais suficiente para que se obtenham preferivelmente 20 ou mais fêmeas grávidas de termo ou próximas deste. Nos casos em que se utilizem substâncias que causam efeitos indesejáveis relacionados com o tratamento (por exemplo, esterilidade, toxicidade excessiva na dose mais elevada), poderá não ser possível cumprir este requisito. O objectivo é a obtenção de um número de fêmeas grávidas suficiente para garantir uma avaliação significativa do potencial da substância para afectar a fecundidade, a gravidez e o comportamento maternal, bem como o aleitamento, o crescimento e o desenvolvimento da prole F_1, desde a concepção até à maturidade, e o desenvolvimento da sua descendência (F_2) até ao desmame. Por esse motivo, a impossibilidade de obter o número desejado de animais prenhes (isto é, 20) não invalida necessariamente o estudo e deve ser avaliada caso a caso.

1.4.2. **Preparação das doses**

Recomenda-se que a substância de ensaio seja administrada oralmente (através da alimentação, na água de beber ou por *gavage*), excepto nos casos em que se considere mais apropriado utilizar outra via de administração (por exemplo, aplicação cutânea ou inalação).

Se for necessário, a substância de ensaio pode ser dissolvida ou suspensa num agente de transporte apropriado. Recomenda-se que, sempre que possível, seja considerada em primeiro lugar a utilização de uma solução/suspensão aquosa; caso tal não seja viável, pode considerar-se o uso de uma solução/emulsão em óleo (por exemplo, óleo de milho); em última instância, poderá eventualmente recorrer-se ao uso de soluções noutros agentes de transporte. Devem conhecer-se as características tóxicas dos agentes de transporte que não sejam a água. Deve determinar-se a estabilidade da substância de ensaio no agente de transporte.

1.4.3. **Dosagem**

Devem utilizar-se pelo menos três níveis de dose e um controlo simultâneo. A escolha do nível de dose máximo deve ter como objectivo produzir um efeito tóxico, mas não a morte ou sofrimento forte, salvo se existirem limitações impostas pela natureza físico-química ou pelas propriedades biológicas da substância de ensaio. Normalmente, consideram-se aceitáveis estudos com mortalidade inesperada, desde que a taxa de mortalidade dos animais progenitores (P) seja inferior a cerca de 10 %. Deve seleccionar-se uma sequência descendente de níveis de dose que permita detectar qualquer efeito relacionado com a dosagem e determinar o nível sem efeitos adversos observáveis (NSEAO). Em muitos casos, a melhor forma de estabelecer estas sequências consiste no espaçamento das doses em série geométrica, usando factores de dois ou de quatro. A adição de um quarto grupo de ensaio é muitas vezes preferível ao uso de intervalos muito grandes entre as dosagens (ou seja, com um factor superior a 10). Quando a substância de ensaio é administrada na alimentação, o espaçamento entre as doses não deve ser superior a um factor de três. A escolha dos níveis de dose deverá considerar todos os dados de toxicidade existentes, em especial os resultados de estudos de dose repetida, devendo ainda levar em conta quaisquer informações relativas ao metabolismo e à cinética dá substância de ensaio ou de substâncias relacionadas. Estas informações poderão também ser usadas para demonstrar a adequação do regime de dosagem.

▼B

O grupo de controlo deve ser um grupo não sujeito a tratamento ou, se for usado um agente de transporte para administrar a substância de ensaio, um grupo de controlo do agente de transporte. Os animais do grupo de controlo devem ser tratados da mesma maneira que os animais dos grupos de ensaio, com excepção do tratamento com a substância de ensaio. Se for usado um agente de transporte, o grupo de controlo deverá receber o volume máximo de agente de transporte utilizado no ensaio. Se a substância de ensaio for administrada na alimentação e causar uma diminuição da ingestão de alimentos e da sua assimilação, poderá ser necessário utilizar um grupo de controlo negativo (submetido ao mesmo regime alimentar reduzido); em alternativa, poderão usar-se os dados de estudos controlados destinados a avaliar os efeitos da diminuição do consumo de alimento nos parâmetros reprodutores.

Deverão ser tomadas em consideração as seguintes características do agente de transporte e outros aditivos: efeitos na absorção, distribuição, metabolismo ou retenção da substância de ensaio; efeitos nas propriedades químicas da substância de ensaio susceptíveis de alterar as suas características tóxicas; e efeitos no consumo de alimentos, na ingestão de água ou no estado nutricional dos animais.

1.4.4. **Ensaio-limite**

Se um estudo com um nível de dose oral de pelo menos 1 000 mg/kg de peso corporal/dia (ou uma percentagem equivalente nos alimentos ou na água de beber, caso se recorra a um destes tipos de administração), realizado de acordo com os procedimentos descritos neste estudo, não provocar efeitos tóxicos observáveis nos animais progenitores nem na sua prole e se, para além disso, os dados existentes sobre compostos estrutural e/ou metabolicamente relacionados com a substância de ensaio não sugerirem a possível ocorrência de toxicidade, poderá considerar-se desnecessário realizar um ensaio completo com vários níveis de dose. O ensaio-limite é sempre válido, excepto nos casos em que se preveja exposição humana e em que seja necessário testar um nível de dose oral mais elevado. Quando se usam outras formas de administração, como inalação ou aplicação cutânea, as propriedades físico-químicas da substância de ensaio (por exemplo, a solubilidade) são muitas vezes indicativas e limitantes do nível máximo de exposição praticável.

1.4.5. **Administração das doses**

Os animais devem ser tratados com a substância de ensaio durante os sete dias da semana. A forma de administração preferida é a via oral (alimentação, água de beber ou *gavage*). Se for usada outra via de administração, deverão ser indicadas as razões subjacentes à sua escolha; neste caso, poderá ser necessário introduzir modificações apropriadas no método de ensaio. Deve utilizar-se o mesmo método de administração em todos os animais durante o período experimental apropriado. A administração por *gavage* deve ser feita com uma sonda gástrica. O volume de líquido administrado numa toma não deve exceder 1 ml/100 g de peso corporal (o volume máximo para óleo de milho é de 0,4 ml/100 g de peso corporal); exceptuam-se as soluções aquosas, que podem ser administradas na proporção de 2 ml/100 g de peso corporal. Deve minimizar-se a variabilidade do volume de ensaio efectuando ajustes nas concentrações, de forma a assegurar a constância do volume em todos os níveis de dose; exceptuam-se os casos em que se utilizam substâncias irritantes ou corrosivas, que normalmente exercem efeitos exacerbados quando aplicadas em concentrações mais elevadas. Normalmente, nos estudos com administração por *gavage*, as crias amamentadas só recebem a substância de ensaio de forma indirecta, através do leite; a dosagem directa inicia-se apenas na altura do desmame. Nos estudos em que a substância de ensaio é administrada na alimentação ou na água de beber, as crias podem receber uma quantidade adicional da substância de ensaio quando, na última semana do período de lactação, começam a comer por si próprias.

▼B

É importante assegurar que as quantidades de substância de ensaio administradas através da alimentação ou da água de beber não interferem nas exigências normais de nutrição ou de consumo de água. Quando a substância de ensaio for incorporada na alimentação, pode utilizar-se uma concentração alimentar constante (ppm) ou, alternativamente, um nível de dose constante em relação ao peso corporal dos animais; deve especificar-se o método escolhido para o ensaio. No caso de uma substância administrada por *gavage*, a dose deve ser administrada todos os dias à mesma hora, devendo ser ajustada pelo menos uma vez por semana a fim de se manter uma dose constante em relação ao peso corporal do animal; estes ajustes deverão ser feitos tendo em conta os dados relativos à distribuição placentária.

1.4.6. **Plano da experiência**

A substância de ensaio começa a ser administrada diariamente aos machos e fêmeas progenitores (P) ao atingirem entre cinco e nove semanas de idade. A dosagem diária dos machos e fêmeas F_1 deve começar na altura do desmame; importa ter presente que, quando a substância de ensaio é administrada através da alimentação ou na água de beber, pode ocorrer exposição directa das crias da geração F_1 à substância de ensaio durante o período de lactação. O tratamento de ambos os sexos das gerações P e F_1 deve decorrer durante pelo menos 10 semanas antes do acasalamento, prosseguindo nas duas semanas do período de acasalamento. Os machos devem ser sacrificados e examinados quando deixam de ser necessários para avaliação de efeitos sobre o aparelho reprodutor. A dosagem das fêmeas progenitoras (P) deve continuar durante a gravidez, prolongando-se até ao desmame da prole F_1. O esquema de administração poderá ser modificado com base em informações relativas à substância de ensaio, incluindo dados sobre toxicidade, indução de metabolismo ou bioacumulação. Normalmente, a dose a administrar a cada animal é calculada com base na determinação mais recente do seu peso corporal. No entanto, o ajuste das doses durante o último terço da gravidez deve ser feito com precaução.

O tratamento dos machos e fêmeas P e F_1 deve continuar até ao momento do sacrifício. Todos os machos e fêmeas adultos P e F_1 devem ser sacrificados quando deixarem de ser necessários para avaliação de efeitos sobre a reprodução. Os animais da descendência F_1 não seleccionados para acasalamento e todos os descendentes F_2 deverão ser sacrificados após o desmame.

1.4.7. **Processo de acasalamento**

1.4.7.1. *Acasalamento dos progenitores (P)*

Para o acasalamento, cada fêmea deve ser colocada juntamente com um único macho pertencente ao mesmo nível de dosagem (acasalamento 1:1) até que ocorra cópula ou tenham decorrido duas semanas. As fêmeas devem ser examinadas diariamente para verificar a presença de esperma ou um rolhão vaginal. Considera-se o dia 0 de gravidez aquele em que se observa um rolhão vaginal e/ou esperma. Quando a tentativa de acasalamento for mal sucedida, poderá tentar-se um novo acasalamento das fêmeas com machos do mesmo grupo comprovadamente aptos a procriar. Os pares acasalados devem ser identificados nos dados do ensaio de forma inequívoca. Deve evitar-se o acasalamento entre irmãos.

▼B

1.4.7.2. *Acasalamento de F_1*

Para o acasalamento da descendência F_1 e produção da geração F_2, devem seleccionar-se pelo menos um macho e uma fêmea de cada ninhada, em altura de desmame, para acasalamento com outras crias pertencentes ao mesmo nível de dose mas provenientes de ninhadas diferentes. A selecção das crias de cada ninhada deve ser feita de forma aleatória, desde que não se verifiquem diferenças significativas no peso corporal ou na aparência dos animais. Caso se observem essas diferenças, devem seleccionar-se os animais mais representativos de cada ninhada. Embora a forma mais correcta de selecção seja aquela que se baseia no peso corporal, em determinadas circunstâncias poderá ser mais conveniente recorrer à aparência. A descendência F_1 só deve acasalar depois de ter atingido a maturidade sexual completa.

Os casais sem descendência devem ser avaliados para determinar as causas da aparente esterilidade. Esta avaliação pode envolver novas tentativas de acasalamento com outros machos ou fêmeas comprovadamente aptos a procriar, o exame microscópico dos órgãos reprodutores e a observação dos ciclos do estro ou da espermatogénese.

1.4.7.3. *Segundo acasalamento*

Em determinadas circunstâncias, tais como situações em que se verifiquem alterações na dimensão da ninhada relacionadas com o tratamento ou em que se observe um efeito ambíguo no primeiro acasalamento, recomenda-se que os adultos P ou F_1 acasalem de novo para produzir uma segunda ninhada. O segundo acasalamento de fêmeas ou machos que não tenham produzido ninhadas deverá ser feito com reprodutores comprovados do sexo oposto. Se numa das gerações for estritamente necessário produzir uma segunda ninhada, os animais devem acasalar novamente cerca de uma semana depois do desmame da última ninhada.

1.4.7.4. *Dimensão das ninhadas*

Os animais devem poder parir normalmente e criar os seus descendentes até ao desmame. A uniformização do tamanho das ninhadas é opcional; caso seja feita, deve descrever-se pormenorizadamente o método usado.

1.5. OBSERVAÇÕES

1.5.1. **Observações clínicas**

Deve efectuar-se diariamente uma observação clínica geral; nos casos em que a dose é administrada por *gavage*, a escolha do momento da observação deve tomar em consideração o período de efeitos máximos previsto que se verifica após a administração da dose. Devem registar-se quaisquer modificações de comportamento, sinais de parto difícil ou prolongado e todos os sinais de toxicidade. Deverá efectuar-se uma inspecção adicional mais pormenorizada de cada animal pelo menos uma vez por semana, que por conveniência poderá coincidir com o momento da pesagem. Para além disso, cada animal deve ser observado duas vezes por dia (ou uma vez por dia durante o fim-de-semana, quando for conveniente) para avaliar morbidade e mortalidade.

▼B

1.5.2. **Peso corporal e consumo de alimento/água dos animais progenitores**

Os animais progenitores (P e F_1) devem ser pesados no primeiro dia de tratamento e, em seguida, pelo menos uma vez por semana. O peso das fêmeas progenitoras (P e F_1) deve ser determinado, no mínimo, nos dias 0, 7, 14 e 20 ou 21 da gestação, durante a lactação (nos dias coincidentes com a pesagem das crias) e no dia do sacrifício. Estas observações devem ser registadas individualmente para cada animal adulto. Durante os períodos de pré-acasalamento e gestação, o consumo de alimento deve ser medido pelo menos semanalmente. Se a substância de ensaio for administrada na água, o consumo de água deve ser determinado pelo menos uma vez por semana.

1.5.3. **Ciclo do estro**

A duração e a normalidade do ciclo do estro nas fêmeas P e F_1 são avaliadas por observação de esfregaços vaginais obtidos antes do acasalamento, durante o acasalamento (opcional) e até existirem evidências de cópula. A remoção de células vaginais/cervicais deve ser feita cuidadosamente, de modo a evitar o distúrbio da mucosa e a subsequente indução de uma gravidez fictícia (1).

1.5.4. **Parâmetros dos espermatozóides**

No momento do sacrifício, deverá registar-se o peso dos testículos e do epidídimo de todos os machos P e F_1 após o sacrifício. Deve reservar-se um exemplar de cada tipo de órgão para exame histopatológico (ver secções 1.5.7 e 1.5.8.1). Para a contagem de espermatídios e de espermatozóides das reservas do conduto epididimário resistentes a homogeneização, deverão usar-se, respectivamente, os testículos e os epidídimos de subgrupos de pelo menos 10 machos de cada grupo P e F_1. Deve colher-se o esperma do conduto epididimário ou do canal deferente dos animais desses subgrupos para avaliar a mobilidade e a morfologia dos espermatozóides. Se forem detectados efeitos relacionados com o tratamento ou se estudos anteriores indicarem possíveis efeitos na espermatogénese, deverão analisar-se os espermatozóides de todos os machos de cada grupo de dose; caso contrário, a contagem pode restringir-se aos machos P e F_1 dos grupos de controlo e de dose máxima.

Deve proceder-se à contagem do número total de espermatídios testiculares e de espermatozóides do conduto epididimário resistentes a homogeneização (2) (3). O número de espermatozóides das reservas do conduto pode ser determinado considerando o volume e a concentração de esperma na suspensão usada para a análise qualitativa e efectuando a contagem de espermatozóides após maceração e/ou homogeneização do restante tecido do conduto. As contagens devem ser feitas nos subgrupos de machos seleccionados de todos os grupos de dosagem e ser levadas a efeito imediatamente após o sacrifício dos animais, excepto se forem feitas gravações de vídeo ou digitais ou se os animais forem congelados para análise posterior. Nestes casos, podem analisar-se primeiro os grupos de controlo e de dose máxima; se não se observarem efeitos relacionados com o tratamento (por exemplo, efeitos na contagem, mobilidade ou morfologia dos espermatozóides), não será necessário avaliar os restantes grupos de dose; caso contrário, deverão analisar-se também os grupos de dosagem inferior.

▼B

A mobilidade dos espermatozóides do epidídimo (ou do canal deferente) deve ser analisada ou gravada em vídeo imediatamente após o sacrifício. O esperma deve ser retirado o mais rapidamente possível, enquanto os danos são mínimos; seguidamente, deve ser diluído para uma análise de mobilidade usando métodos aprovados (4). A determinação da percentagem de espermatozóides progressivamente móveis poderá ser tanto subjectiva como objectiva. Quando se realiza uma análise de mobilidade assistida por computador (5) (6) (7) (8) (9) (10), a determinação da mobilidade progressiva baseia-se em valores críticos definidos pelo utilizador em relação à velocidade média e à rectitude da trajectória, ou índice linear. Se existirem gravações em vídeo de amostras (11) ou outras imagens obtidas durante a necropsia, pode efectuar-se posteriormente a análise dos machos P e F_1 dos grupos de controlo e de dose máxima. Se não se observarem efeitos relacionados com o tratamento, será desnecessário avaliar os restantes grupos de dose; caso contrário, deverão analisar-se também os grupos de dosagem inferior. Caso não existam imagens de vídeo ou digitais, todas as amostras de todos os grupos de tratamento devem ser analisadas no momento da necropsia.

Deve efectuar-se a análise morfológica de uma amostra de espermatozóides epididimários (ou do canal deferente). Depois de fixados, os espermatozóides (pelo menos 200 por amostra) são examinados em preparações húmidas (12) e classificados como normais ou anormais. As anomalias morfológicas em espermatozóides incluem fusão, cabeças isoladas e ausência de cabeças e/ou de caudas. A avaliação deve ser feita nos subgrupos de machos seleccionados de todos os grupos de dose, quer imediatamente após o sacrifício dos animais, quer posteriormente, usando gravações de vídeo ou digitais. Depois de fixados, os esfregaços podem também ser guardados para análise posterior. Nestas situações, podem analisar-se primeiro os grupos de controlo e de dose máxima. Se não se observarem efeitos relacionados com o tratamento (por exemplo, efeitos na morfologia dos espermatozóides), não será necessário analisar os restantes grupos de dose; caso contrário, deverão analisar-se também os grupos de dosagem inferior.

Caso um dos parâmetros de avaliação de espermatozóides acima mencionados tenha sido examinado anteriormente num estudo sistémico de toxicidade de pelo menos 90 dias, poderá considerar-se desnecessário repetir a sua avaliação no estudo em duas gerações. Recomenda-se, no entanto, que se guardem amostras ou gravações digitais de espermatozóides da geração P para possibilitar uma avaliação posterior, caso esta venha a ser necessária.

1.5.5. **Descendência**

Cada ninhada deve ser examinada o mais cedo possível após o parto (dia 0 de lactação) para se determinar o número e o sexo das crias, os nados-mortos, os nados-vivos e a presença de anomalias macroscópicas. Caso não se encontrem maceradas, as crias encontradas mortas no dia 0 devem ser examinadas para determinar eventuais malformações e a causa da morte; estes animais devem manter-se conservados. As crias vivas devem ser contadas e pesadas individualmente no momento do nascimento (dia 0 de lactação) ou no dia 1; a partir daí, os pesos devem ser avaliados em dias regulares de pesagem, por exemplo, nos dias 4, 7, 14 e 21 de lactação. Devem registar-se as alterações físicas ou de comportamento observadas nas mães ou nos descendentes.

▼B

A avaliação do desenvolvimento físico da descendência deve basear-se principalmente no aumento do peso corporal. Outros parâmetros físicos (por exemplo, abertura dos olhos e ouvidos, erupção dos dentes, crescimento de pêlo) poderão dar informações suplementares. No entanto, estes dados deverão ser considerados preferencialmente no contexto da maturação sexual (por exemplo, idade e peso corporal no momento da abertura vaginal ou da separação bálano-prepucial) (13). Devem efectuar-se avaliações de desempenho (por exemplo, actividade motora, função sensorial e ontogenia dos reflexos) da descendência F_1 antes e/ou depois do desmame, dedicando especial atenção aos aspectos relacionados com a maturação sexual, caso não tenham sido incluídas em estudos independentes. Deve determinar-se a idade da abertura vaginal e da separação do prepúcio nos animais recém-desmamados seleccionados para acasalamento. Se forem detectadas alterações na proporção entre os sexos ou no tempo de maturação sexual dos animais F_1, deverá medir-se a distância anogenital das crias F_2 no dia 0 pós-natal.

As observações de desempenho poderão ser omitidas em grupos que revelem claramente outros sinais de efeitos adversos (por exemplo, um decréscimo significativo na progressão do peso, etc.). Caso se realizem, as avaliações de desempenho não devem ser efectuadas em crias seleccionadas para acasalamento.

1.5.6. **Necropsia macroscópica**

Todos os animais progenitores (P e F_1), bem como todas as crias apresentando anomalias externas ou sinais clínicos e uma cria seleccionada aleatoriamente das gerações F_1 e F_2, escolhida ao acaso quanto ao sexo e à ninhada de origem, devem ser analisados macroscopicamente no momento do sacrifício ou da morte no decurso do estudo para se detectar qualquer anomalia estrutural ou alteração patológica; deverá dedicar-se uma atenção especial aos órgãos do aparelho reprodutor. Caso não se encontrem maceradas, as crias sacrificadas, em estado moribundo ou encontradas mortas devem ser examinadas para se determinarem eventuais malformações e/ou a causa da morte; estes animais devem manter-se conservados.

Devem examinar-se os úteros de todas as fêmeas primíparas a fim de se detectarem a presença e o número de locais de implantação; este exame deverá ser feito de forma a não comprometer a avaliação histopatológica.

1.5.7. **Pesagem dos órgãos**

No momento do sacrifício, deverá determinar-se o peso do corpo e dos seguintes órgãos de todos os animais progenitores P e F_1 (os órgãos pares devem ser pesados individualmente):

— útero, ovários,

— testículos, epidídimo (total e conduto),

— próstata,

— vesículas seminais, glândulas coagulantes e respectivos fluidos e próstata (como uma unidade),

— cérebro, fígado, rins, baço, glândula pituitária, tiróide, glândulas supra-renais e órgãos-alvo conhecidos.

Devem determinar-se os pesos corporais terminais das crias F_1 e F_2 seleccionadas para necropsia, devendo ainda pesar-se o cérebro, o baço e o timo de uma cria seleccionada aleatoriamente quanto ao sexo e à ninhada de origem (ver secção 1.5.6).

▼B

Sempre que possível, a avaliação dos resultados da necropsia macroscópica e da pesagem de órgãos deverá ser efectuada tendo em conta os dados de outros estudos de dose repetida.

1.5.8. **Histopatologia**

1.5.8.1. *Animais progenitores*

Devem ser fixados e conservados em meio adequado para exame histopatológico os seguintes órgãos e tecidos de animais progenitores (P e F_1) (ou amostras representativas):

— vagina, útero com colo e ovários (preservados em fixador adequado);

— um testículo (preservado em fixador de Bouin ou equivalente), um epidídimo, vesículas seminais, próstata e glândula coagulante;

— órgão(s)-alvo previamente identificado(s) de todos os animais P e F_1 seleccionados para acasalamento.

Serão objecto de um exame histopatológico completo os órgãos e tecidos conservados acima mencionados de todos os animais P e F_1 dos grupos de controlo e de dose máxima seleccionados para acasalamento. A inspecção dos ovários dos animais P é opcional. Serão examinados os órgãos que apresentem alterações relacionadas com o tratamento dos animais dos grupos de doses média e baixa, a fim de auxiliar a determinação do NSEAO. Adicionalmente, deverá efectuar-se a avaliação histopatológica dos órgãos reprodutores de animais dos grupos de dose média e baixa suspeitos de fertilidade reduzida (por exemplo, animais com insucesso no acasalamento, concepção, geração ou parto de uma descendência saudável, ou animais com alterações nos ciclos do estro ou no número, mobilidade ou morfologia dos espermatozóides). Deverão examinar-se todas as lesões macroscópicas, tais como atrofias ou tumores.

Os testículos devem ser objecto de um exame histopatológico pormenorizado (por exemplo, usando fixador de Bouin, inclusão em parafina e secções transversais com 4-5μm de espessura) a fim de se detectarem efeitos relacionados com o tratamento, tais como retenção de espermatídios, ausência de camadas ou tipos de células germinais, células gigantes multinucleadas ou perda de células espermatogénicas para o lúmen (14). O exame do epidídimo intacto deve abranger a cabeça, o corpo e o conduto e pode efectuar-se por observação de uma secção longitudinal. A análise do epidídimo destina-se a detectar infiltração de leucócitos, alteração na prevalência de tipos de células, tipos de células aberrantes e fagocitose de espermatozóides. Os órgãos reprodutores masculinos podem ser examinados recorrendo ao uso de PAS (ácido p-aminossalicílico) e coloração com hematoxilina.

Os ovários no período pós-lactação devem conter folículos primordiais e folículos em crescimento, bem como os grandes corpos amarelos da lactação. O exame histopatológico deverá detectar uma diminuição qualitativa da população de folículos primordiais. As fêmeas F_1 devem ser submetidas a uma avaliação quantitativa dos folículos primordiais; o número de animais, a selecção da secção do ovário e o tamanho da amostra seccionada devem ser adequados, do ponto de vista estatístico, para o procedimento de avaliação usado. O exame deve incluir a contagem do número de folículos primordiais (que poderão estar combinados com pequenos folículos em crescimento) em ovários de tratamento e em ovários de controlo, para posterior comparação de resultados (15) (16) (17) (18) (19).

▼B

1.5.8.2. *Animais recém-desmamados*

Devem ser fixados e conservados em meio apropriado para exame histopatológico os tecidos e órgãos-alvo com anomalias macroscópicas de todas as crias que apresentem anomalias externas ou sinais clínicos, bem como de uma cria seleccionada aleatoriamente das gerações F_1 e F_2, escolhida ao acaso quanto ao sexo e à ninhada de origem e que não tenha sido seleccionada para acasalamento. Deve efectuar-se a caracterização histopatológica completa do tecido conservado, dando especial atenção aos órgãos do aparelho reprodutor.

2. **DADOS**

2.1. TRATAMENTO DOS RESULTADOS

Os dados devem ser registados individualmente e resumidos na forma de quadros, indicando, em relação a cada grupo de ensaio e cada geração, o número de animais no início do ensaio, o número de animais encontrados mortos durante o ensaio ou sacrificados, o momento de todas as mortes ou sacrifícios, o número de animais férteis, o número de fêmeas grávidas, o número de animais com manifestações de toxicidade, uma descrição dos sinais de toxicidade observados (incluindo o momento do aparecimento, a duração e a intensidade), os tipos de observações feitas nos progenitores e nos descendentes, os tipos de alterações histopatológicas e todos os dados relevantes relativos às ninhadas.

Os resultados numéricos devem ser avaliados com um método estatístico adequado e geralmente aceite; a escolha do método estatístico deve constar do planeamento do estudo e ser devidamente justificada. Os modelos estatísticos dose-resposta podem ser úteis para a análise dos dados. O relatório deve incluir informação suficiente sobre o método de análise e o programa informático usados para que um examinador/estatístico independente possa reavaliar e reconstituir a análise.

2.2. ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os dados recolhidos no estudo de toxicidade sobre a reprodução em duas gerações, incluindo os relativos aos exames microscópicos e necropsias, deverão ser analisados em termos dos efeitos observados. A análise deverá considerar a relação (ou a ausência de relação) entre a dose da substância de ensaio e a presença ou ausência, incidência e gravidade de anomalias, incluindo lesões macroscópicas, órgãos identificados como alvos, alterações da fertilidade, anomalias clínicas, alterações da reprodução e procriação, alterações do peso corporal, efeitos na mortalidade e quaisquer outros efeitos tóxicos. A análise dos resultados do ensaio deve ainda ter em conta as propriedades físico-químicas da substância de ensaio, assim como informação toxicocinética, se disponível.

Um ensaio de toxicidade sobre a reprodução bem elaborado deverá fornecer uma estimativa satisfatória do nível sem efeito e dar conhecimento dos efeitos adversos na reprodução, parturição, lactação e desenvolvimento pós-natal, incluindo o crescimento e o desenvolvimento sexual.

▼B

2.3. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

A finalidade de um estudo de toxicidade sobre a reprodução em duas gerações consiste na obtenção de informações relativas aos efeitos de exposição repetida a uma substância durante todas as fases do ciclo reprodutor. Mais especificamente, o estudo fornece informações sobre os parâmetros reprodutores, bem como sobre o desenvolvimento, o crescimento, a maturação e a sobrevivência da descendência. A interpretação dos resultados deve tomar em consideração dados de estudos subcrónicos, de desenvolvimento pré-natal e toxicocinéticos, entre outros eventualmente disponíveis. Os resultados deste estudo podem ser usados para avaliar a necessidade de realizar ensaios suplementares sobre uma substância química. A extrapolação dos resultados para a espécie humana tem uma validade limitada; mais adequado será usar os dados do ensaio para obter informação sobre níveis sem efeito e níveis toleráveis de exposição humana (20) (21) (22) (23).

3. **RELATÓRIO**

3.1. RELATÓRIO DO ENSAIO

O relatório do ensaio deverá incluir as seguintes informações:

Substância de ensaio:

— natureza física e, se relevante, propriedades físico-químicas;

— dados de identificação;

— pureza.

Agente de transporte (se apropriado):

— caso o agente de transporte não seja água, uma justificação para a sua escolha.

Animais de ensaio:

— espécie/estirpe usada;

— número, idade e sexo dos animais;

— proveniência, condições de alojamento, dieta, materiais de nidificação, etc.;

— pesos individuais dos animais no início do ensaio.

Condições de ensaio:

— razões que presidiram à escolha dos diferentes níveis de doses;

— informação pormenorizada sobre a formulação da substância de ensaio/preparação da dieta, concentrações atingidas;

— estabilidade e homogeneidade da preparação;

— informação pormenorizada sobre a administração da substância de ensaio;

— conversão da concentração da substância de ensaio na dieta/ /água de beber (ppm) para a dose real (mg/kg de peso corporal/ /dia), se aplicável;

— informação pormenorizada sobre a qualidade dos alimentos e da água.

▼B

Resultados:

— consumo de alimentos, consumo de água (se disponível), eficiência do regime alimentar (aumento do peso corporal por grama de alimento consumido) e consumo da substância de ensaio pelos animais P e Fl, excepto durante o período de coabitação e durante pelo menos o último terço do período de lactação;

— dados de absorção (se disponíveis);

— dados dos pesos corporais dos animais P e F_1 seleccionados para acasalamento;

— pesos das ninhadas e das crias;

— peso corporal no momento do sacrifício e pesos absolutos e relativos dos órgãos dos animais progenitores;

— natureza, gravidade e duração de efeitos detectados em observações clínicas (reversíveis ou não);

— momento da morte no decurso do estudo ou indicação dos animais sobreviventes no termo da experiência;

— dados de resposta tóxica por sexo e por dose, incluindo índices de acasalamento, fertilidade, gestação, nascimento, viabilidade e lactação; os números usados para calcular estes índices devem constar do relatório;

— efeitos tóxicos (ou outros) na reprodução, descendência, crescimento pós-natal, etc.;

— resultados da necropsia;

— descrição pormenorizada de todas as observações histopatológicas;

— número de fêmeas P e F_1 com ciclos normais e duração dos ciclos;

— número total de espermatozóides no conduto epididimário; percentagem de espermatozóides progressivamente móveis; percentagem de espermatozóides morfologicamente normais e percentagem de espermatozóides que apresentam cada uma das anomalias identificadas;

— duração do acasalamento, incluindo o número de dias até à sua concretização;

— duração do período de gestação;

— número de implantações, corpos amarelos, dimensão da ninhada;

— número de nados-vivos e de perdas pós-implantação;

— número de crias com anomalias macroscópicas visíveis; deve indicar-se o número de animais de tamanho inferior ao normal, caso tenha sido determinado;

— dados sobre aspectos físicos característicos das crias e outros dados de desenvolvimento pós-natal; deve ser dada uma justificação relativamente à escolha dos aspectos físicos analisados;

— dados sobre observações de desempenho nas crias e adultos, se aplicável;

— tratamento estatístico dos resultados, se apropriado.

▼B

Análise dos resultados.

Conclusões, incluindo os valores dos NSEAO para efeitos sobre as mães e os descendentes.

4. **REFERÊNCIAS**

(1) Sadleir, R.M.F.S., (1979) Cycles and Seasons, In: *Reproduction in Mammals:* I. Germ Cells and Fertilization, C.R. Auston and R.V. Short (eds.), Cambridge, New York.

(2) Gray, L.E. et al., (1989) A Dose-Response Analysis of Methoxychlor-Induced Alterations of Reproductive Development and Function in the Rat. *Fundamental and Applied Toxicology*, 12, p. 92-108.

(3) Robb, G.W. et al., (1978) Daily Sperm Production and Epididymal Sperm Reserves of Pubertal and Adult Rats. *Journal of Reproduction and Fertility*, 54 p. 103-107.

(4) Klinefelter, G.R. et al., (1991) The Method of Sperm Collection Significantly Influences Sperm Motion Parameters Following Ethane Dimethanesulfonate Administration in the Rat. *Reproductive Toxicology*, 5, p. 39-44

(5) Seed, J. et al., (1996) Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog: a Consensus Report. *Reproductive Toxicology*, 10(3), p. 237-244.

(6) Chapin, R.E. et al., (1992) Methods for Assessing Rat Sperm Motility. *Reproductive Toxicology*, 6, p. 267-273

(7) Klinefelter, G.R. et al., (1992) Direct Effects of Ethane Dimethanesulphonate on Epididymal Function in Adult Rats: an *In Vitro* Demonstration. *Journal of Andrology*, 13, p. 409-421.

(8) Slott, V.L. et al., (1991) Rat Sperm Motility Analysis: Methodologic Considerations. *Reproductive Toxicology*, 5, p. 449--458.

(9) Slott, V.L. and Perreault, S.D., (1993) Computer-Assisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using the Hamilton-Thorn Motility Analyzer. In: *Methods in Toxicology,* Part A., Academic, Orlando, Florida, p. 319-333.

(10) Toth, G.P. et al., (1989) The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorhydrin Administration: Methodologic and Statistical Considerations. Journal of Andrology, 10, p. 401-415.

(11) Working, P.K. and M. Hurtt, (1987) Computerised Videomicrographic Analysis of Rat Sperm Motility. Journal of Andrology, 8, p. 330-337.

(12) Linder, R.E. et al., (1992) Endpoints of Spermatoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants. Reproductive Toxicology, 6, p. 491-505.

(13) Korenbrot, C.C. et al., (1977) Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat. Biological Reproduction, 17, p. 298303.

(14) Russell, L.D. et al., (1990) Histological and Histopathological Evaluation of the Testis, Cache River Press, Clearwater, Florida.

(15) Heindel, J.J. and R.E. Chapin, (eds.) (1993) Part B. Female Reproductive Systems, Methods in Toxicology, Academic, Orlando, Florida.

(16) Heindel, J.J. et al., (1989) Histological Assessment of Ovarian Follicle Number in Mice As a Screen of Ovarian Toxicity. In: Growth Factors and the Ovary, A.N. Hirshfield (ed.), Plenum, New York, p. 421-426.

(17) Manson, J.M. and Y.J. Kang, (1989) Test Methods for Assessing Female Reproductive and Developmental Toxicology. In: Principles and Methods of Toxicology, A.W. Hayes (ed.), Raven, New York.

▼B

(18) Smith, B.J. et al,., (1991) Comparison of Random and Serial Sections in Assessment of Ovarian Toxicity. Reproductive Toxicology, 5, p. 379-383.

(19) Heindel, J.J., (1999) Oocyte Quantitation and Ovarian Histology. In: An Evaluation and Interpretation of Reproductive Endpoints for Human Health Risk Assessment, G. Daston and C.A. Kimmel (eds.), ILSI Press, Washington, DC.

(20) Thomas, J. A., (1991) Toxic Responses of the Reproductive System. In: Casarett and Doull's Toxicology, M.O. Amdur, J. Doull, and C.D. Klaassen (eds.), Pergamon, New York.

(21) Zenick, H. and E.D. Clegg, (1989) Assessment of Male Reproductive Toxicity: A Risk Assessment Approach. In: Principles and Methods of Toxicology, A.W. Hayes (ed.), Raven Press, New York.

(22) Palmer, A.K., (1981) In: Developmental Toxicology, Kimmel, C.A. and J. Buelke-Sam (eds.), Raven Press, New York.

(23) Palmer, A.K., (1978) In Handbook of Teratology, Vol. 4, J.G. Wilson and F.C. Fraser (eds.), Plenum Press, New York.

▼M4

B.36. **TOXICOCINÉTICA**

INTRODUÇÃO

1. Este método é equivalente ao *Test Guideline* 417 da OCDE (2010). Os estudos toxicocinéticos realizados aos produtos químicos visam obter informações adequadas sobre a absorção, distribuição, biotransformação (metabolismo) e excreção dos mesmos, facilitar o estabelecimento de uma relação entre a concentração ou dose e a toxicidade observada e contribuir para a compreensão do mecanismo através do qual os produtos químicos em causa exercem a sua toxicidade. A toxicocinética pode ajudar a elucidar os estudos toxicológicos, ao demonstrar que a exposição dos animais ao produto químico em estudo é de natureza sistémica e ao revelar quais são as entidades circulantes (produto químico parental ou metabolitos deste). Os parâmetros toxicocinéticos básicos extraídos destes estudos também fornecem informações sobre o potencial de acumulação do produto químico em questão nos tecidos e/ou órgãos e sobre o potencial de indução de biotransformações devidas à exposição ao produto químico em causa.

2. Os dados toxicocinéticos podem ser úteis para apreciar a adequação e pertinência da extrapolação de dados de toxicidade em animais com vista à avaliação de perigos e/ou riscos para o ser humano. Os estudos toxicocinéticos também podem proporcionar informações úteis para a determinação das doses a utilizar em estudos de toxicidade (cinética linear ou não linear), bem como da relação entre a via de administração e os efeitos produzidos, da biodisponibilidade e de outros aspetos, relativos à conceção do estudo. Determinados tipos de dados toxicocinéticos podem servir para construir modelos toxicocinéticos de base fisiológica.

3. Os dados toxicocinéticos e metabólicos são importantes a diversos títulos. Podem, por exemplo, dar indicações acerca de possíveis efeitos tóxicos e modos de ação, bem como sobre a relação destes com as doses e com a via de exposição. Por outro lado, os dados metabólicos podem proporcionar informações úteis para avaliar a importância, no plano toxicológico, da exposição a metabolitos exógenos do produto químico em estudo.

4. Dispor de dados toxicocinéticos adequados ajudará a confirmar a aceitabilidade e aplicabilidade de métodos baseados em relações estrutura-atividade, interpolações e agrupamentos para avaliar a segurança de produtos químicos. Os dados cinéticos também podem servir para avaliar a pertinência toxicológica de outros estudos (por exemplo, *in vivo* e *in vitro*).

5. Salvo indicação em contrário (ver, nomeadamente, os pontos 74 a 78), este método pressupõe a administração por via oral do produto químico em estudo.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

6. As diversas regulamentações estabelecem exigências e necessidades diferentes quanto aos efeitos e parâmetros toxicocinéticos a medir relativamente a cada classe de produtos químicos (pesticidas, biocidas, produtos químicos industriais, etc.). Contrariamente à maioria dos outros métodos, este método descreve ensaios toxicocinéticos que compreendem múltiplas medições e múltiplos efeitos observados. Futuramente, poderão vir a ser elaborados novos métodos de ensaio e/ou documentos de orientação que individualizem e pormenorizem mais cada efeito observado. No que respeita ao presente método, cada regulamentação estabelece as exigências e/ou necessidades ao nível dos ensaios e avaliações a realizar.

▼M4

7. São numerosos os estudos que podem ser realizados para avaliar o comportamento toxicocinético de produtos químicos para efeitos da regulamentação aplicável. Todavia, consoante as necessidades ou situações concretas ao nível da regulamentação, nem todos esses estudos poderão ser necessários para avaliar o produto químico em causa. Na conceção de estudos toxicocinéticos é necessário ser flexível e ter em conta as características do produto químico em causa. Em alguns casos, pode ser suficiente explorar um determinado conjunto de questões para atender aos perigos e riscos associados ao produto químico em causa. Por vezes, podem obter-se dados toxicocinéticos no âmbito da avaliação efetuada no quadro de outros estudos toxicológicos. Noutros casos, podem ser necessários estudos toxicocinéticos suplementares e/ou mais aprofundados, se a regulamentação o exigir e/ou ou se a avaliação do produto químico em causa suscitar novas interrogações.

8. A fim de melhorar a qualidade do estudo e de evitar o recurso desnecessário a animais, antes de realizar o estudo o laboratório deve ponderar todas as informações disponíveis sobre o produto químico em causa e os metabolitos e análogos deste. Entre essas informações podem contar-se dados obtidos por outros métodos de ensaio pertinentes (estudos *in vivo* ou *in vitro* e/ou avaliações *in silico* — ou seja, por simulação computacional). No planeamento do estudo e na interpretação dos resultados pode ser útil ter presente as propriedades físico-químicas (tais como o coeficiente de partição octanol/água, expresso em log P_{OW}, o pKa, a hidrossolubilidade, a pressão de vapor e o peso molecular) do produto químico em causa. Estas propriedades podem determinar-se pelos métodos adequados descritos nos métodos de ensaio correspondentes.

LIMITAÇÕES

9. Este método não se adapta a casos especiais, tais como fêmeas grávidas ou em lactação e progenituras, nem à avaliação de eventuais resíduos em animais destinados à alimentação humana expostos. Todavia, os dados provenientes de estudos pelo método B.36 podem fornecer informações suscetíveis de orientar a conceção de estudos específicos para esses casos. O presente método não se destina ao ensaio de nanomateriais. Um relatório do exame preliminar da aplicabilidade das *Test Guidelines* da OCDE aos nanomateriais (1) indica que a *Test Guideline 417* (equivalente ao presente método) pode não se aplicar a estes materiais.

DEFINIÇÕES

10. Definem-se no apêndice alguns conceitos utilizados neste método.

CONSIDERAÇÕES DE BEM-ESTAR ANIMAL

11. O documento de orientações n.º 19 da OCDE (2) contém orientações sobre o tratamento ético dos animais. Recomenda-se a consulta deste documento da OCDE relativamente a todos os estudos *in vivo* e *in vitro* referidos no presente método de ensaio.

DESCRIÇÃO DOS MÉTODOS

Estudos-piloto

12. Recomenda-se e incentiva-se a realização de estudos-piloto para escolher os parâmetros experimentais para os estudos de toxicocinética (por exemplo, metabolismo, balanço de massas, protocolos analíticos, dosagens, exalação de CO_2, etc.). A caracterização de alguns destes parâmetros pode dispensar o recurso a produtos químicos com marcação radioativa.

▼M4

Escolha dos animais

Espécie

13. De preferência, a espécie e a estirpe dos animais utilizados nos ensaios de toxicocinética devem ser idênticas às utilizadas nos outros estudos toxicológicos realizados com o produto químico em causa. Normalmente utiliza-se o rato, espécie amplamente usada nos estudos toxicológicos. Pode justificar-se o recurso a outras espécies ou a utilização de espécies adicionais se estudos toxicológicos importantes evidenciarem efeitos tóxicos significativos nessas espécies ou se a toxicidade/toxicocinética nessas espécies for comprovadamente mais pertinente para o ser humano. É necessário justificar a escolha da espécie e da estirpe de animal.

14. Salvo menção em contrário, este método pressupõe que a espécie ensaiada é o rato. Se forem utilizadas outras espécies, pode ser necessário alterar determinados aspetos do método.

Idade e estirpe

15. Devem ser utilizados animais adultos, jovens e saudáveis, normalmente com 6 a 12 semanas na altura da exposição (ver também os pontos 13 e 14). É necessário justificar o recurso a animais que não sejam adultos jovens. No início do estudo, os animais devem ter todos idades aproximadas. As diferenças de peso de animal para animal não devem desviar-se mais de 20 % do peso médio de todos os animais do grupo. Idealmente, a estirpe utilizada deve ser idêntica à utilizada para constituir a base de dados toxicológicos do produto químico em causa.

Número e sexo dos animais

16. Para cada dose ensaiada, o número mínimo de animais é de quatro de um dos sexos, sendo necessário justificar o sexo dos animais utilizados. Deve ponderar-se a utilização de animais de ambos os sexos (quatro machos e quatro fêmeas) caso haja indícios de diferenças significativas de toxicidade entre os sexos.

Condições de alojamento e de alimentação

17. Normalmente, os animais são alojados individualmente durante o ensaio. Em circunstâncias especiais, pode justificar-se um alojamento agrupado. A iluminação deve ser artificial, com uma sequência de 12 horas de luz seguidas de 12 horas de escuridão. A temperatura do biotério deve ser de 22 °C ± 3 °C; a humidade relativa de 30 % a 70 %. Na alimentação, podem utilizar-se dietas convencionais de laboratório e deve ser fornecida água de beber sem restrições.

Produto químico em estudo

18. Em todos os aspetos do estudo relacionados com o balanço de massas e com a identificação dos metabolitos, o produto químico utilizado deve estar marcado com o isótopo radioativo ^{14}C. Todavia, se puder demonstrar-se que:

— é possível efetuar o balanço de massas e identificar os metabolitos utilizando o produto químico sem marcação radioativa,

— a especificidade e a sensibilidade analíticas do método sem o produto químico com marcação radioativa são iguais ou superiores às que se obteriam com marcação radioativa,

▼M4

não será necessário utilizar um produto químico com marcação radioativa. Por outro lado, podem utilizar-se outros isótopos radioativos ou estáveis, especialmente se o elemento em questão for a causa da toxicidade ou integrar a parte tóxica do produto químico em estudo. Se possível, o marcador radioativo deve localizar-se numa parte central da molécula que seja estável ao metabolismo (não permutável, não metabolizada em CO_2 nem passa a fazer parte dos radicais monocarbonados do organismo). Para discernir o destino metabólico do produto químico em estudo, pode ser necessário marcar vários pontos ou determinadas regiões da sua molécula.

19. É necessário determinar o grau de pureza e identificar os produtos químicos com e sem marcação radioativa recorrendo a métodos de análise adequados. A pureza radiológica de um produto químico radioativo deve ser a máxima atingível no caso desse produto químico (idealmente superior a 95 %) e deve fazer-se um esforço razoável para identificar as impurezas cuja concentração seja igual ou superior a 2 %. O grau de pureza, bem como a identidade e a proporção das impurezas identificadas, devem constar do relatório. Determinados programas obrigatórios podem optar por fornecer orientações suplementares para a definição e caracterização dos produtos químicos constituídos por misturas, bem como de métodos para determinação da pureza.

Escolha das doses

Estudo-piloto

20. Normalmente, é suficiente no estudo-piloto uma dose única por via oral. A dose não deve ser tóxica, mas deve ser suficientemente elevada para possibilitar a identificação dos metabolitos nas excreções (e no plasma, se for caso disso), assim como para a consecução dos objetivos do estudo-piloto, expressos no ponto 12.

Estudos principais

21. Nos estudos principais, é preferível ensaiar pelo menos duas doses, dado que as informações obtidas a partir desse número mínimo de grupos de dose podem facilitar a escolha das doses a ensaiar noutros estudos de toxicidade, bem como a avaliação da relação dose-resposta em ensaios de toxicidade já realizados.

22. Se forem administradas duas doses, ambas devem ser suficientemente elevadas para possibilitar a identificação dos metabolitos nas excreções (e no plasma, se for caso disso). Na escolha das doses devem ponderar-se as informações extraíveis dos dados de toxicidade disponíveis. Caso não se disponha de informações (provenientes, por exemplo, de estudos de toxicidade aguda por via oral nos quais se registem sinais clínicos de toxicidade ou de estudos de toxicidade por dose repetida), pode ponderar-se, para dose mais elevada, um valor inferior à estimativa da DL_{50} (vias oral e dérmica) ou à estimativa da CL_{50} (via inalatória) ou um valor inferior ao valor mais baixo do intervalo de toxicidade aguda estimado. A dose mais baixa deve ser uma fração da dose mais elevada.

23. Caso o estudo incida apenas numa dose, idealmente esta deve ser suficientemente elevada para possibilitar a identificação dos metabolitos nas excreções (e no plasma, se for caso disso), sem gerar efeitos tóxicos visíveis. Se não for ensaiada uma segunda dose, é necessário justificá-lo.

24. Se for necessário determinar o efeito da dose nos processos cinéticos, duas doses podem não ser suficientes e pelo menos uma das doses utilizadas deve ser suficientemente elevada para saturar esses processos. Uma evolução não linear da área abaixo da curva da concentração no plasma em função do tempo (AUC) entre duas doses utilizadas no estudo principal constitui indício forte da saturação de um ou mais processos cinéticos algures entre essas duas doses.

▼M4

25. No caso dos produtos químicos de baixa toxicidade, deve utilizar-se uma dose máxima de 1 000 mg/kg de peso corporal pelas vias oral ou dérmica; se a administração for por via inalatória, ver orientações no capítulo B.2 deste anexo, mas normalmente a dose máxima não excederá 2 mg/l. Por razões específicas ligadas ao produto químico em estudo, pode ser necessária uma dose mais elevada, consoante o exija a regulamentação aplicável. É sempre necessário justificar as doses escolhidas.

26. Os dados toxicocinéticos e de distribuição pelos tecidos obtidos a partir de uma dose única podem ser suficientes para determinar o potencial de acumulação e/ou de persistência. Todavia, em determinadas circunstâncias, pode ser necessário administrar repetidamente a dose, para melhor avaliar o potencial de acumulação e/ou de persistência ou a evolução dos parâmetros toxicocinéticos (por exemplo, a indução e a inibição enzimáticas) ou para responder às exigências da regulamentação aplicável. Nos estudos com repetição de doses, é normalmente suficiente utilizar doses baixas, mas, em determinadas circunstâncias, também pode ser necessário utilizar doses elevadas (ver também o ponto 57).

Administração do produto químico em estudo

27. Deve dissolver-se o produto químico em estudo, ou preparar-se uma suspensão homogénea do mesmo, no mesmo veículo utilizado nos outros estudos de toxicidade oral com administração por sonda esofágica efetuados com o produto químico em causa, se esse veículo for conhecido. É necessário justificar o veículo escolhido. A escolha do veículo e do volume de dosagem são aspetos a considerar na conceção do estudo. O método habitual de administração é por sonda esofágica. Todavia, em determinadas situações, pode ser vantajoso proceder à administração por meio de uma cápsula de gelatina ou por incorporação na dieta, sendo necessário justificar ambas as opções. É igualmente necessário dispor de meios de verificação da dose efetivamente administrada a cada animal.

28. O volume máximo de líquido a administrar de cada vez por meio de sonda esofágica depende do tamanho do animal, do tipo de veículo de dosagem e da suspensão ou não da alimentação antes da administração do produto químico em estudo. É necessário explicar por que razão se mantém ou se restringe a alimentação antes da administração das doses. Normalmente, o volume utilizado deve ser o menor possível, tanto no caso dos veículos aquosos como dos veículos não aquosos. No caso dos roedores, o volume das doses não deve, normalmente, exceder 10 mg/kg de peso corporal. No caso dos produtos químicos mais lipofílicos, o volume do veículo pode ser de 4 ml/kg de peso corporal ou superior. Nos casos de administração repetida das doses, em que o jejum diário seria contraindicado, pode ponderar-se utilizar volumes de dose inferiores (por exemplo, 2 a 4 ml/kg de peso corporal). Se possível, deve procurar utilizar-se volumes de dose coerentes com os administrados noutros estudos orais por sonda esofágica do produto químico em causa.

29. A administração intravenosa do produto químico em estudo e a medição do teor deste no sangue e/ou nas excreções pode servir para determinar a biodisponibilidade ou a absorção oral relativa. Nos estudos por via intravenosa, administra-se uma dose única (normalmente equivalente à dose mais baixa por via oral, sem a exceder — ver a escolha das doses) do produto químico num veículo adequado. Administra-se a dose num volume adequado (por exemplo, 1 ml/kg de peso corporal), no local de administração escolhido, a, pelo menos, quatro animais do sexo adequado (caso se justifique, podem utilizar-se animais de ambos os sexos — ver o ponto 16). É necessário dissolver completamente ou preparar uma suspensão integral da dose do produto químico em estudo a administrar por via intravenosa. O veículo utilizado nesta via de administração não deve interferir no fluxo sanguíneo nem afetar as células sanguíneas. Se o produto químico em estudo for injetado por meio de bombagem, é necessário indicar no relatório a velocidade de perfusão e esta deve ser normalizada para todos os animais. Caso se proceda à encanulação da veia jugular (para administração do

▼M4

produto químico em estudo e/ou para colheita de sangue) ou se utilize a artéria femoral para a administração do produto químico, é necessário anestesiar o animal. Há que ponderar bem o tipo de anestesia, dado que esta pode influenciar a toxicocinética. Os animais devem poder restabelecer-se convenientemente antes de lhes ser administrado o produto químico em estudo incorporado no veículo.

30. No caso de determinados produtos químicos, pode recorrer-se a outras vias de administração, como as vias dérmica ou inalatória (ver os pontos 74 a 78), em função das propriedades físico-químicas do produto químico em causa e da utilização ou exposição humanas previsíveis.

Medições

Balanço de massas

31. Estabelece-se o balanço de massas somando as quantidades correspondentes às percentagens da dose (radioativa) administrada excretadas na urina, nas fezes e no ar expirado e as quantidades correspondentes às percentagens presentes nos tecidos, na carcaça restante e nas águas de lavagem da gaiola (ver o ponto 46). Em geral, consideram-se adequadas recuperações totais do produto químico (radioatividade) administrado superiores a 90 %.

Absorção

32. Pode efetuar-se uma primeira estimativa da absorção excluindo do balanço de massas as quantidades correspondentes à percentagem da dose presente no trato gastrointestinal e/ou nas fezes. Para o cálculo da percentagem de absorção, ver o ponto 33. Para a análise das excreções, ver os pontos 44 a 49. Se não for possível determinar com exatidão, por meio de um balanço de massas, a absorção subsequente a uma administração por via oral (por exemplo, se mais de 20 % da dose administrada estiver presente nas fezes), podem ser necessários estudos mais aprofundados. Estes estudos podem compreender a administração oral do produto químico e a determinação deste na bílis ou a administração oral e intravenosa do produto químico e a determinação da diferença entre as quantidades deste presentes na urina, no ar expirado e na carcaça, depois de administrado por cada uma destas vias. Em ambos os casos, mede-se a radioatividade em vez de efetuar uma análise química específica do produto químico em estudo e dos seus metabolitos.

33. Para estudar a excreção biliar, normalmente procede-se à administração por via oral. Neste estudo, insere-se uma cânula no ducto biliar de, pelo menos, quatro animais do sexo adequado (ou, caso se justifique, de ambos os sexos), procedendo-se à administração de uma única dose do produto químico em estudo. Depois desta administração, deve monitorizar-se a excreção de radioatividade/do produto químico em estudo na bílis durante o tempo necessário para estimar a percentagem da dose administrada que é excretada por esta via, a qual se pode utilizar para calcular, em seguida, a percentagem de absorção por via oral:

$$\text{Percentagem de absorção} = \begin{array}{l}(\text{quantidade presente na bílis} + \text{na urina} + \text{no ar expirado} + \\ \text{na carcaça, com exclusão da quantidade presente no trato} \\ \text{gastrointestinal})/\text{quantidade administrada} \times 100\end{array}$$

34. No caso de determinadas classes de produtos químicos, a dose absorvida pode ser diretamente segregada através das membranas intestinais. Nesses casos, a determinação da percentagem da dose administrada presente nas fezes após administração de uma dose por via oral a ratos com uma cânula inserida no ducto biliar não se considera representativa da dose não absorvida. Recomenda-se que, nos casos em que se preveja secreção intestinal, se calcule a percentagem da dose que é absorvida a partir de um cálculo da absorção por comparação da excreção após administração por via oral e por via intravenosa (ratos intactos ou com uma cânula inserida no ducto biliar) — ver o ponto 35. Recomenda-se igualmente que, se for considerado necessário quantificar a secreção intestinal, se meça a excreção após administração por via intravenosa em ratos com uma cânula inserida no ducto biliar.

▼M4

Biodisponibilidade

35. Pode determinar-se a biodisponibilidade a partir da cinética no plasma/no sangue dos grupos expostos por via oral e por via intravenosa, conforme se descreve nos pontos 50 a 52, efetuando análises químicas específicas do produto químico em estudo e/ou do(s) metabolito(s) correspondente(s) e dispensando-se, portanto, a marcação radioativa do produto químico em causa. Pode então calcular-se a biodisponibilidade (F) do produto químico em estudo ou do(s) metabolito(s) correspondente(s) do seguinte modo:

$$F = (AUC_{exp}/AUC_{IV}) \times (Dose_{IV}/Dose_{exp})$$

em que AUC é a área abaixo da curva de concentração no plasma em função do tempo e "exp" é a via experimental (oral, dérmica ou inalatória).

36. A fim de avaliar o risco de efeitos sistémicos, é geralmente preferível recorrer à biodisponibilidade do componente tóxico, em vez da percentagem de absorção, para comparar as concentrações sistémicas em estudos efetuados em animais com dados análogos de biomonitorização provenientes de estudos de exposição profissional. A situação pode tornar-se mais complexa se as doses se situarem numa zona de resposta não linear, pelo que é importante que um estudo toxicocinético prévio permita escolher uma gama de doses com resposta linear.

Distribuição pelos tecidos

37. O conhecimento da distribuição pelos tecidos do produto químico em estudo e/ou dos metabolitos do mesmo é importante para a identificação dos tecidos-alvo e para a compreensão dos mecanismos subjacentes à toxicidade, bem como para obter informações sobre o potencial de acumulação e persistência do produto químico e dos metabolitos. Pelo menos no termo do estudo de excreção (normalmente até sete dias após a administração da dose, em função do comportamento do produto químico em estudo), deve medir-se a percentagem da dose (radioativa) total presente nos tecidos e na carcaça restante. Caso não se detete o produto químico nos tecidos no final do estudo (por exemplo, por aquele ter sido eliminado anteriormente, devido a uma meia vida curta), importa não interpretar mal os dados. Nessas situações, é necessário examinar a distribuição pelos tecidos quando se atinge a concentração máxima do produto químico (e/ou dos metabolitos) no plasma/no sangue (T_{max}) ou a taxa máxima de excreção urinária (ver o ponto 38). Além disso, pode ser necessário colher tecidos noutros momentos para determinar a distribuição do produto químico em estudo (e/ou dos metabolitos) pelos tecidos, para avaliar a eventual dependência do tempo, para facilitar o balanço de massas e/ou se a autoridade competente o exigir. Entre os tecidos a colher contam-se o fígado, gordura, o trato gastrointestinal, os rins, o baço, o sangue total, a carcaça restante, os órgãos-alvo e quaisquer outros (por exemplo, a tiroide, eritrócitos, os órgãos reprodutores, a pele e — sobretudo em animais pigmentados — os olhos) potencialmente importantes para a avaliação toxicológica do produto químico em estudo. Deve-se procurar examinar o máximo de tecidos nos mesmos momentos, para otimizar a utilização dos animais e no caso de, em estudos de toxicidade crónica ou subcrónica, se observarem efeitos tóxicos em órgãos-alvo. Deve indicar-se igualmente no relatório as concentrações do resíduo (radioativo) e a relação entre essas concentrações nos tecidos e no plasma (no sangue).

38. A avaliação da distribuição pelos tecidos noutros momentos, tais como o momento em que são atingidos o pico de concentração no plasma/no sangue (por exemplo, T_{max}) ou a taxa máxima de excreção urinária, obtida, respetivamente, nos ensaios cinéticos do plasma/do sangue e nos ensaios de excreção urinária, também pode ser uma exigência das autoridades competentes. As informações neste domínio podem facilitar a compreensão da toxicidade e do potencial de acumulação e persistência do produto químico em estudo e dos metabolitos. É necessário justificar a escolha das amostras. As amostras a analisar são geralmente as já indicadas (ver o ponto 37).

▼M4

39. Nos estudos da distribuição pelos tecidos, pode quantificar-se a radioatividade procedendo à dissecação, homogeneização, combustão e/ou solubilização dos órgãos e depois à contagem da cintilação em fase líquida dos resíduos retidos. Determinadas técnicas, atualmente em diversos estádios de desenvolvimento — por exemplo, a autorradiografia quantitativa de corpo inteiro e a autorradiografia microscópica dos recetores —, podem ser úteis para determinar a distribuição do produto químico em estudo pelos órgãos e/ou tecidos (3)(4).

40. Se a via de exposição não for a via oral, deve colher-se e analisar-se determinados tecidos específicos, tais como os pulmões, nos estudos por inalação, e a pele, nos estudos por via dérmica. Ver os pontos 74 a 78.

Metabolismo

41. É necessário recolher as excreções (e, se for caso disso, colher amostras de plasma) para proceder à identificação e quantificação do produto químico inalterado e dos metabolitos do mesmo, como se descreve nos pontos 44 a 49. Para facilitar a identificação dos metabolitos, aceita-se a reunião das excreções de um determinado grupo de dose. Recomenda-se que se estabeleça o perfil dos metabolitos correspondente a cada período do estudo. Todavia, se a falta de amostras e/ou de radioatividade o inviabilizar, aceita-se a reunião da urina e das fezes correspondentes a diversos momentos do estudo, mas não das correspondentes aos dois sexos ou a doses diferentes. Na análise da urina, das fezes, da radioatividade presente no ar expirado pelos animais expostos e da bílis devem ser utilizados métodos qualitativos e quantitativos adequados.

42. Deve fazer-se um esforço razoável para identificar os metabolitos presentes em concentrações iguais ou superiores a 5 % da dose administrada e para traçar um esquema metabólico do produto químico em estudo. Se a quantidade do produto químico em estudo nas excreções representar 5 % ou mais da dose administrada, é necessário que o produto químico seja aí identificado. Entende-se por "identificação" a determinação da estrutura exata dos componentes. Normalmente, procede-se à identificação efetuando simultaneamente um traçado cromatográfico (cocromatografia) do metabolito e de padrões conhecidos, por dois sistemas diferentes, ou recorrendo a técnicas que permitam determinar a estrutura, tais como a espetrometria de massa, a ressonância magnética nuclear e outras. No caso da cocromatografia, não se considera que o recurso a técnicas cromatográficas que utilizem a mesma fase estacionária com dois sistemas de solventes diferentes constitua uma verificação por dois métodos adequada da identidade dos metabolitos, dado que os métodos não seriam independentes. A identificação por cocromatografia deve processar-se mediante o recurso a dois sistemas diferentes e independentes no plano analítico, tais como a cromatografia em camada fina normal ou com inversão de fases e a HPLC (cromatografia em fase líquida de alta eficiência). Se a qualidade da separação cromatográfica for adequada, não é necessária uma confirmação por meios espetroscópicos. Para uma identificação inequívoca, também pode recorrer-se a métodos que forneçam informações estruturais, tais como cromatografia em fase líquida/espetrometria de massa, cromatografia em fase líquida/espetrometria de massa, seguida de nova espetrometria de massa (em tandem), cromatografia em fase gasosa/espetrometria de massa e espetrometria de ressonância magnética nuclear.

43. Se não for possível identificar os metabolitos que representem, individualmente, 5 % ou mais da dose administrada, deve constar do relatório final uma justificação ou explicação disso. Pode ser útil identificar metabolitos que representem menos de 5 % da dose administrada, para melhorar a compreensão da via metabólica com vista à avaliação dos perigos e/ou riscos associados ao produto químico em estudo. Sempre que possível, deve apresentar-se uma confirmação da estrutura. Para isso, pode ser necessário estabelecer o perfil metabólico no plasma, no sangue ou noutros tecidos.

▼M4

Excreção

44. Para conhecer a taxa e o grau de excreção da dose administrada, determina-se a percentagem da dose (radioativa) recuperada na urina, nas fezes e no ar expirado, dados que também são necessários para o balanço de massas. Devem determinar-se as quantidades do produto químico em estudo (radioatividade) eliminadas na urina, nas fezes e no ar expirado a intervalos de tempo adequados (ver os pontos 47 a 49). Os ensaios por dose repetida devem ser concebidos de maneira a possibilitarem a recolha de dados de excreção para cumprir convenientemente os objetivos descritos no ponto 26, o que permitirá efetuar comparações com os ensaios de dose única.

45. Se um estudo-piloto tiver revelado que não são excretadas no ar expirado quantidades significativas (de acordo com o ponto 49) do produto químico (radioatividade), não é necessário recolher o ar expirado no estudo definitivo.

46. Para a recolha das excreções (urina, fezes e ar expirado), coloca-se cada animal numa unidade individual de estudo do metabolismo. No final de cada período de recolha (ver os pontos 47 a 49), lavam-se essas unidades com um solvente adequado ("lavagem da gaiola"), para máxima recuperação do produto químico em estudo (da radioatividade). A recolha das excreções deve terminar ao sétimo dia ou quando tiverem sido recolhidos 90 % da dose administrada, consoante o que ocorrer primeiro.

47. Deve determinar-se a quantidade total do produto químico em estudo (radioatividade) na urina em dois momentos, pelo menos, do primeiro dia de recolha — um dos quais 24 horas após a administração da dose — e posteriormente uma vez por dia, até ao termo do estudo. Incentiva-se que, no primeiro dia, haja mais de dois momentos de recolha (por exemplo, às 6, 12 e 24 horas). Devem analisar-se os resultados dos estudos-piloto a fim de tirar ilações sobre momentos de recolha diferentes ou suplementares. É necessário fundamentar os programas de recolha.

48. Deve determinar-se diariamente a quantidade total do produto químico em estudo (radioatividade) nas fezes, com início 24 horas após a administração da dose e até ao termo do estudo, a menos que os estudos-piloto aconselhem momentos de recolha diferentes ou suplementares. É necessário fundamentar programas de recolha diferentes.

49. Caso se detete menos de 1 % da dose administrada no ar expirado num período de 24 horas, pode cessar-se a recolha do CO_2 expirado e de outros produtos voláteis no estudo em curso.

Estudos em função do tempo

Cinética no plasma/no sangue

50. Estes estudos visam obter estimativas dos principais parâmetros toxicocinéticos – por exemplo, C_{max}, T_{max}, meia vida ($t_{1/2}$) e AUC – do produto químico em estudo. Podem efetuar-se com a administração de uma dose única, mas geralmente administram-se duas ou mais doses. A escolha das doses depende da natureza do ensaio e/ou do aspeto em estudo. Os dados cinéticos podem ser necessários para resolver questões como a da biodisponibilidade do produto químico e/ou para elucidar o efeito da dose na eliminação (por exemplo, para verificar se a saturação da eliminação depende ou não da dose).

51. O número mínimo de animais a utilizar nestes estudos é de quatro animais de um dos sexos por grupo de dose. É necessário justificar o sexo dos animais utilizados. Deve ponderar-se a utilização de animais de ambos os sexos (quatro machos e quatro fêmeas) caso haja indícios de diferenças significativas de toxicidade entre os sexos.

▼M4

52. Após a administração do produto químico em estudo (com marcação radioativa), devem colher-se amostras de sangue de cada animal em momentos adequados e segundo um método apropriado. O volume e o número de amostras de sangue que podem colher-se em cada animal podem estar limitados pelos efeitos potenciais de colheitas sucessivas na saúde/fisiologia do animal e/ou pela sensibilidade do método analítico. Devem analisar-se amostras correspondentes a cada animal. Em determinadas circunstâncias (por exemplo, a caracterização de metabolitos), pode ser necessário reunir amostras colhidas em diversos animais. Essa reunião de amostras deve ser justificada e as amostras dela resultantes devem ser claramente identificadas. Caso se utilize um produto químico com marcação radioativa, pode justificar-se determinar a radioatividade total presente. Se assim for, deve determinar-se a radioatividade total no sangue total e no plasma, ou no plasma e nos eritrócitos, para cálculo da razão sangue/plasma. Noutras situações, podem ser necessários estudos mais específicos que passem pela identificação de compostos parentais e/ou de metabolitos ou pela avaliação da fixação a proteínas.

Outros estudos cinéticos em tecidos

53. Estes estudos visam obter informações sobre a evolução no tempo, para elucidar questões relacionadas com aspetos como o modo da ação tóxica, a bioacumulação e a biopersistência, mediante a determinação dos níveis do produto químico em estudo em diversos tecidos. A escolha dos tecidos e o número de momentos a avaliar dependerão do aspeto a elucidar e da base de dados toxicológicos disponível para o produto químico. Na conceção destes estudos cinéticos complementares em tecidos, devem ser tidos em conta as informações reunidas conforme se descreveu nos pontos 37 a 40. Estes estudos podem efetuar-se com uma única dose ou repetindo a dose. É necessário justificar pormenorizadamente as opções tomadas.

54. Entre as razões que podem justificar a realização de outros estudos cinéticos em tecidos contam-se as seguintes:

— meia vida prolongada no sangue, indiciadora da possível acumulação do produto químico em estudo em diversos tecidos,

— interesse em verificar se foi atingido um estado estacionário em determinados tecidos (por exemplo, em estudos por dose repetida, embora a concentração do produto químico em estudo no sangue possa aparentemente ter atingido um estado estacionário, pode ser útil confirmar se também se atingiu uma concentração estacionária nos tecidos-alvo).

55. Neste tipo de estudos em função do tempo, deve administrar-se por via oral uma dose adequada do produto químico em causa a, pelo menos, quatro animais por dose e por ponto temporal, medindo-se a distribuição ao longo do tempo nos tecidos escolhidos. Podem utilizar-se animais todos do mesmo sexo, a menos que os efeitos tóxicos observados evidenciem alguma especificidade sexual. Também consoante o aspeto a elucidar, assim se analisarão ou não a radioatividade total ou o produto químico parental e/ou os metabolitos. Avalia-se a distribuição pelos tecidos recorrendo a técnicas adequadas.

Indução/inibição enzimáticas

56. Num ou mais dos seguintes casos pode ser necessário estudar eventuais efeitos de indução/inibição enzimáticas ou a biotransformação do produto químico em estudo:

1) Se houver indícios de uma relação entre a biotransformação do produto químico e o aumento da toxicidade do mesmo;

2) Se os dados de toxicidade disponíveis revelarem uma relação não linear entre a dose e o metabolismo;

▼M4

3) Se os estudos de identificação dos metabolitos tiverem identificado um metabolito potencialmente tóxico que possa ter sido produzido por uma via enzimática induzida pelo produto químico em estudo;

4) Para explicar efeitos supostamente ligados a fenómenos de indução enzimática;

5) No caso de experiências *in vitro* ou *in vivo* com espécies e condições diferentes, se forem observadas alterações toxicológicas significativas do perfil metabólico do produto químico em estudo, situação em que pode ser necessário caracterizar a(s) enzima(s) em causa (por exemplo, enzimas da fase I, tais como as isoenzimas do sistema das mono-oxigenases dependentes do citocromo P450, enzimas da fase II, tais como isoenzimas da sulfotransferase ou da uridina-difosfato-glucoronosiltransferase, ou qualquer outra enzima pertinente). Estas informações podem ser utilizadas para avaliar a pertinência da espécie em causa para extrapolações interespécies.

57. Para avaliar variações toxicocinéticas ligadas ao produto químico em estudo, devem ser utilizados protocolos de estudo adequados, devidamente validados e fundamentados. Constituem exemplos desses estudos a administração repetida de doses do produto químico não marcado, seguida de uma dose única com marcação radioativa ao décimo quarto dia, ou a administração repetida de doses do produto químico com marcação radioativa, seguida da colheita de amostras ao primeiro, sétimo e décimo quarto dias para determinação dos perfis metabólicos. A administração repetida de doses do produto químico em estudo com marcação radioativa também pode fornecer informações sobre a bioacumulação (ver o ponto 26).

OUTRAS ABORDAGENS

58. Além das experiências *in vivo* descritas no presente método, há outras possibilidades de obter informações úteis sobre a absorção, a distribuição, o metabolismo ou a eliminação de produtos químicos em determinadas espécies.

Utilização de dados obtidos *in vitro*

59. Utilizando sistemas de ensaio adequados, podem estudar-se *in vitro* diversos aspetos relativos ao metabolismo de um produto químico. Podem utilizar-se hepatócitos recentemente isolados ou de cultura ou frações subcelulares (por exemplo, microssomas e citosol ou a fração S9) hepáticas para estudar possíveis metabolitos. O metabolismo local no órgão-alvo — por exemplo, os pulmões — pode ter interesse para a avaliação dos riscos. As frações microssómicas de tecidos-alvo podem ser úteis para esse efeito. Os estudos com microssomas podem ter utilidade para investigar eventuais diferenças entre os sexos ou relacionadas com o estádio vital e para caracterizar parâmetros enzimáticos (K_m e V_{max}) que podem facilitar a avaliação de dependências entre o metabolismo e as doses de exposição. Por outro lado, os microssomas podem ser úteis na identificação das enzimas microssomáticas que participam no metabolismo do produto químico em estudo, aspeto que pode ser importante para as extrapolações interespécies (ver também o ponto 56). Pode igualmente examinar-se o potencial de indução de biotransformação utilizando frações subcelulares hepáticas (por exemplo, os microssomas e o citosol) de animais pré-expostos ao produto químico em causa, através de estudos de indução de hepatócitos *in vitro* ou a partir de linhagens celulares específicas que exprimam as enzimas pertinentes. Em determinadas circunstâncias e em condições adequadas, pode ponderar-se a utilização de frações subcelulares provenientes de tecidos humanos para determinar eventuais diferenças entre espécies ao nível da biotransformação. Os resultados de estudos *in vitro* também podem ter utilidade no desenvolvimento de modelos toxicocinéticos de base fisiológica (5).

▼M4

60. A partir de estudos *in vitro* de absorção por via dérmica podem obter-se informações suplementares para caracterização da absorção (6).

61. Pode utilizar-se culturas primárias de células hepáticas e cortes recentes de tecidos para estudar aspetos semelhantes aos estudados com os microssomas hepáticos. Em certos casos, poderão elucidar-se determinadas questões utilizando linhagens celulares que exprimam especificamente a enzima em causa, ou linhagens celulares geneticamente modificadas. Noutros casos, pode ser útil estudar *in vitro* a inibição e indução de isozimas específicas do citocromo P450 (por exemplo, CYP1A1, 2E1, 1A2, etc.), e/ou de enzimas da fase II, pelo composto parental. As informações obtidas podem ser úteis para compostos com estrutura semelhante.

Utilização como informação complementar de dados toxicocinéticos provenientes de estudos de toxicidade

62. A análise de amostras de sangue, tecidos e/ou excreções obtidas noutros estudos de toxicidade pode fornecer dados sobre a biodisponibilidade, a evolução da concentração no plasma ao longo do tempo (AUC, C_{max}), o potencial de bioacumulação, as velocidades de eliminação e diferenças metabólicas ou cinéticas ligadas ao sexo ou ao estádio vital.

63. Pode efetuar-se adaptações ao nível da conceção do estudo para elucidar questões relacionadas com a saturação das vias de absorção, de biotransformação e de excreção a doses elevadas, com o funcionamento de novas vias metabólicas a essas doses ou com o confinamento dos metabolitos tóxicos a tais doses.

64. Outros aspetos ligados à avaliação dos perigos que podem ser examinados:

— sensibilidade dependente da idade, devido a diferenças no estado da barreira hemato-encefálica, ao nível renal e/ou nas capacidades de desintoxicação,

— sensibilidade de determinadas subpopulações devido a diferentes capacidades de biotransformação ou a outras diferenças toxicocinéticas,

— grau de exposição fetal por transferência transplacentária do produto químico ou grau de exposição neonatal através da lactação.

Utilização de modelos toxicocinéticos

65. Os modelos toxicocinéticos podem ser úteis para diversos aspetos da avaliação dos perigos e dos riscos, por exemplo, na previsão da exposição sistémica e da dose transmitida aos tecidos internos. Estes modelos também podem ter utilidade para elucidar determinadas questões relativas ao modo de ação, podendo servir de base para extrapolações interespécies, vias de exposição e perfis de dosagem, bem como para avaliar o risco para o ser humano. Entre os dados úteis para o desenvolvimento de modelos toxicocinéticos de base fisiológica para um produto químico numa determinada espécie contam-se 1) os coeficientes de partição, 2) as constantes bioquímicas e os parâmetros fisiológicos, 3) os parâmetros de absorção específicos da via de exposição e 4) dados cinéticos *in vivo* para aferição dos modelos – por exemplo, parâmetros de eliminação para as vias de excreção pertinentes (> 10 %) ou K_m e V_{max} para o metabolismo. Os dados experimentais utilizados no desenvolvimento de modelos devem ser obtidos por métodos cientificamente consistentes e os resultados da aplicação dos modelos devem ser validados. Para facilitar o desenvolvimento de modelos não compartimentais ou de base fisiológica, determinam-se frequentemente parâmetros específicos do produto químico em estudo ou da espécie em causa, tais como taxas de absorção, o coeficiente de repartição entre o sangue e os tecidos e as constantes metabólicas.

▼M4

DADOS E RELATÓRIOS

66. Recomenda-se que o relatório do estudo tenha um índice.

Corpo do relatório

67. O corpo do relatório deve estar organizado nas seguintes secções e subsecções e conter as informações previstas no presente método:

Resumo

68. Deve resumir a conceção do estudo e descrever os métodos utilizados. Deve igualmente salientar os principais resultados, nomeadamente os relativos ao balanço de massas, à natureza e importância dos metabolitos, aos resíduos nos tecidos, à taxa de eliminação, ao potencial de bioacumulação e às diferenças entre os sexos. Deve ser suficientemente pormenorizado para possibilitar a avaliação dos resultados.

Introdução

69. Deve compreender os objetivos, os fundamentos e a conceção do estudo, bem como as referências pertinentes e os eventuais elementos históricos.

Objetos e métodos do estudo

70. Deve descrever pormenorizadamente todas as informações pertinentes, nomeadamente:

a) Produto químico em estudo

Relativamente à identificação do produto químico, deve compreender a denominação química, a estrutura molecular, a composição química qualitativa e quantitativa, o grau de pureza química e, se possível, o tipo e a quantidade de cada impureza. Deve compreender igualmente informações sobre as propriedades físico-químicas, nomeadamente o estado físico, a cor, a solubilidade bruta e/ou o coeficiente de partição, a estabilidade e, se for caso disso, a corrosividade. Se aplicável, devem ser fornecidos elementos relativos aos isómeros. Se o produto químico em estudo tiver marcação radioativa, deve indicar-se o tipo de radionuclídeo, a posição do marcador, a atividade específica e o grau de pureza radioquímica.

É igualmente necessário indicar o tipo de cada veículo, diluente, agente de suspensão, emulsionante ou qualquer outra matéria utilizada para administrar o produto químico em estudo, ou descrevê-los.

b) Animais estudados

Deve compreender informações sobre os animais estudados, nomeadamente: escolha da espécie e da estirpe e justificação da escolha, idade no início do estudo, sexo, peso corporal, estado de saúde e manutenção dos animais.

c) Métodos

Deve explicar a conceção do estudo e o método utilizado e incidir nos seguintes elementos:

1) Justificação das alterações da via ou das condições de exposição eventualmente efetuadas;

▼M4

2) Justificação das doses escolhidas;

3) Descrição dos estudos-piloto eventualmente utilizados na conceção experimental dos estudos subsequentes, incluindo os dados de base provenientes dos primeiros;

4) Modo de preparação da solução administrada e tipo de solvente ou veículo, se tiver sido utilizado algum;

5) Número de grupos expostos e número de animais por grupo;

6) Nível e volume das doses (e a atividade correspondente, caso se utilize marcação radioativa);

7) Via(s) e métodos de administração;

8) Frequência da administração;

9) Período de jejum (se for o caso);

10) Radioatividade total por animal;

11) Manipulação dos animais;

12) Colheita e tratamento das amostras;

13) Métodos analíticos utilizados na separação, quantificação e identificação de metabolitos;

14) Limites de deteção dos métodos utilizados;

15) Outras medições e protocolos experimentais utilizados (incluindo a validação dos métodos de análise dos metabolitos).

d) Análise estatística

Caso os resultados do estudo sejam objeto de análise estatística, devem incluir-se informações suficientes sobre o método de análise estatística e o programa informático utilizados para o efeito, para que um avaliador ou perito estatístico independente possa reexaminar e reconstituir a análise.

Se o estudo recorrer a modelos sistémicos, por exemplo, modelos toxicocinéticos de base fisiológica, os modelos utilizados devem ser descritos em pormenor, para que possam ser reconstituídos e validados de forma independente (ver o ponto 65 e o apêndice "Definições").

Resultados

71. Os dados devem ser resumidos e ser apresentados em quadros, juntamente com uma avaliação estatística adequada, e ser complementados por uma explicação no campo de texto correspondente. Os dados das contagens de radioatividade devem ser resumidos e ser apresentados da maneira mais adequada ao estudo – normalmente em microgramas ou miligramas equivalentes por massa de amostra, embora possam utilizar-se outras unidades. Devem inserir-se gráficos ilustrativos dos resultados, reproduzir-se os dados cromatográficos e espetrométricos representativos, identificar-se e quantificar-se os metabolitos, especificando a estrutura molecular dos mesmos, e propor-se as vias metabólicas correspondentes. Esta secção deve ainda conter os seguintes elementos que se justifiquem:

1) Quantidade e percentagem de recuperação de radioatividade na urina, nas fezes, no ar expirado e na lavagem (urina e fezes) da gaiola;

— nos estudos por via dérmica, devem incluir-se igualmente dados relativos à recuperação do produto químico em estudo na pele exposta e nas lavagens da pele, dados relativos à radioatividade residual na cobertura de proteção da pele e na unidade metabólica e os resultados do estudo de lavagem da pele. Para mais informações, ver os pontos 74 a 77,

▼M4

— nos estudos por via inalatória, devem incluir-se igualmente dados relativos à recuperação do produto químico em estudo nos pulmões e nos tecidos nasais (8). Para mais informações, ver o ponto 78;

2) Distribuição pelos tecidos, expressa em percentagem da dose administrada e em concentração (microgramas equivalentes por grama de tecido), e razões tecido/sangue e tecido/plasma;

3) Balanço de matérias referente a cada estudo no qual sejam analisados os tecidos corporais e as excreções;

4) Concentrações no plasma e parâmetros toxicocinéticos (biodisponibilidade, AUC, C_{max}, T_{max}, eliminação, meia vida) depois da administração pela(s) via(s) de exposição correspondente(s);

5) Taxa e grau de absorção do produto químico em estudo depois da administração pela(s) via(s) de exposição correspondente(s);

6) Quantidades do produto químico em estudo e de metabolitos (em percentagem da dose administrada) recolhidas nas excreções;

7) Referência aos dados por animal apresentados em apêndice para todos os parâmetros medidos (por exemplo, dose administrada, percentagem de recuperação, concentrações, parâmetros toxicocinéticos, etc.);

8) Figura com as vias metabólicas propostas e com as estruturas moleculares dos metabolitos.

Discussão e conclusões

72. Elementos a constar desta secção:

1) Proposta de via metabólica baseada nos resultados do metabolismo e da eliminação do produto químico em estudo;

2) Discussão das eventuais diferenças ligadas à espécie ou ao sexo no que respeita à eliminação e/ou biotransformação do produto químico em estudo;

3) Quadros e discussão relativos à identificação e importância dos metabolitos, às taxas de eliminação, ao potencial de bioacumulação e ao nível de resíduos do composto parental e/ou do(s) metabolito(s) deste nos tecidos, bem como a eventuais alterações dos parâmetros toxicocinéticos em função da dose;

4) Dados toxicocinéticos pertinentes obtidos em estudos de toxicidade;

5) Conclusão concisa, fundamentada nos resultados do estudo;

6) As subsecções suplementares eventualmente necessárias.

73. Pode inserir-se outras secções para incluir informações bibliográficas, quadros, figuras, apêndices, etc. complementares.

▼M4

VIAS ALTERNATIVAS DE EXPOSIÇÃO

Via dérmica

Exposição por via dérmica

74. Esta secção é dedicada aos estudos toxicocinéticos de produtos químicos administrados por via dérmica. No que respeita à absorção por esta via, consultar o capítulo B.44, "Absorção cutânea: método *in vivo*" (9) deste anexo. Para outros critérios, como a distribuição e o metabolismo, pode recorrer-se ao presente método. Na exposição por via dérmica pode utilizar-se um ou mais níveis de dose do produto químico em estudo. Este (por exemplo, o produto químico puro, uma diluição do mesmo ou uma formulação que o contenha, a aplicar na pele) deve ser o produto químico ao qual as pessoas ou outras espécies potencialmente afetadas poderão estar expostas, ou um substituinte realista do mesmo. O nível ou níveis de dose devem escolher-se conforme foi explicado nos pontos 20 a 26. São fatores a ter em conta na escolha da(s) dose(s) a administrar por via dérmica a exposição humana prevista e/ou as doses que se revelaram tóxicas noutros estudos de toxicidade por via dérmica. Se necessário, a dose ou doses a administrar por via dérmica devem ser dissolvidas num veículo adequado, sendo em seguida administrado(s) o(s) volume(s) adequado(s) da(s) dose(s). Pouco antes do início do ensaio, cortam-se os pelos da região dorsal dos animais. Caso se rapem os pelos com uma lâmina, esta operação deve ser efetuada cerca de 24 horas antes do ensaio. Ao cortar ou rapar os pelos do animal, é necessário tomar precauções para evitar lesões da pele que possam alterar a permeabilidade desta. A percentagem da superfície do corpo do animal da qual se devem eliminar os pelos para a aplicação do produto químico em estudo é de aproximadamente 10 %. Se o produto químico em causa for muito tóxico, a superfície exposta pode ser inferior a 10 %, mas deve cobrir-se com uma camada fina e uniforme o máximo possível de superfície. A superfície exposta deve ser a mesma para todos os grupos de animais que participam no ensaio por via dérmica. As superfícies expostas devem ser protegidas com uma cobertura adequada que não saia do lugar. Os animais devem ser alojados separadamente.

75. Para determinar a quantidade da dose do produto químico em estudo aplicada que pode remover-se da pele lavando a superfície de pele exposta com um sabão suave e água, efetua-se um estudo de lavagem da pele. Este estudo também pode ser útil para estabelecer o balanço de massas quando o produto químico for administrado por via dérmica. Para realizar um estudo de lavagem da pele, aplica-se uma dose única do produto químico em causa a dois animais. Escolhe-se a dose de acordo com o ponto 23 do presente método (relativamente ao tempo de contacto com a pele, ver o ponto 76). Para avaliar a eficácia da remoção do produto químico em estudo por este método de lavagem, determinam-se as quantidades do mesmo nas águas de lavagem.

76. A menos que a corrosividade o inviabilize, uma vez aplicado, o produto químico em estudo deve manter-se em contacto com a pele durante, pelo menos, seis horas. Uma vez retirada a cobertura de proteção, lava-se a superfície exposta conforme se explicou para o estudo de lavagem da pele no ponto 75. Em seguida, pesquisam-se resíduos do produto químico em estudo na cobertura de proteção e nas águas de lavagem. No final dos ensaios, eutanasiam-se os animais de acordo com a referência 2 e remove-se-lhes a pele exposta. Em seguida, analisa-se uma secção adequada dessa pele para determinar os resíduos do produto químico em estudo (a radioatividade) nela presentes.

77. Para a avaliação toxicocinética de produtos farmacêuticos, podem ser necessários protocolos diferentes, em observância da regulamentação aplicável.

▼**M4**

Via inalatória

78. Deve utilizar-se uma concentração única do produto químico em estudo, embora possam utilizar-se mais, se for necessário. A concentração ou concentrações devem escolher-se conforme foi explicado nos pontos 20 a 26. A exposição por inalação deve efetuar-se com um cone nasal ou com um capacete, para evitar absorções por outras vias (8). Se as condições de exposição por inalação forem diferentes, é necessário justificar e documentar as alterações. Deve precisar-se a duração da exposição (normalmente de quatro a seis horas).

REFERÊNCIAS:

(1) OCDE (2009). Preliminary Review of OECD Test Guidelines for their Applicability to Manufactured Nanomaterials. Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 15. ENV/JM/MONO(2009)21, OCDE, Paris.

(2) OCDE (2000). Guidance Document on Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 19. ENV/JM/MONO(2000), OCDE, Paris.

(3) Solon E.G., Kraus L. (2002). Quantitative whole-body autoradiography in the pharmaceutical industry; Survey results on study design, methods, and regulatory compliance. *J. Pharm. and Tox. Methods* 46:73-81.

(4) Stumpf W.E. (2005). Drug localization and targeting with receptor microscopic autoradiography. *J. Pharmacological and Toxicological Methods* 51:25-40.

(5) Loizou G., Spendiff M., Barton H.A., Bessems J., Bois F.Y., d'Yvoire M.B., Buist H., Clewell H.J. 3rd, Meek B., Gundert-Remy U., Goerlitz G., Schmitt W. (2008). Development of good modelling practice for physiologically based pharmacokinetic models for use in risk assessment: The first steps. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 50:400 – 411.

(6) Capítulo B.45 deste anexo, "Absorção cutânea: Método *in vitro*".

(7) IPCS (2010). Characterization and application of Physiologically-Based Pharmacokinetic Models in Risk Assessment. IPCS Harmonization Project Document No. 9. Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety.

(8) OCDE (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Series on Testing and Assessment No. 39. ENV/JM/MONO(2009)28, OCDE, Paris.

(9) Capítulo B.44 deste anexo, "Absorção cutânea: Método *in vivo*".

(10) Barton H.A., *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. *Critical Reviews in Toxicology* 36:9-35.

(11) Gibaldi M., Perrier D., (1982), Pharmacokinetics, 2.ª edição. Marcel Dekker, Inc., New York.

▼M4

Apêndice

DEFINIÇÕES

***Absorção**:* processo ou processos através dos quais um produto químico atravessa tecidos ou neles penetra. Diz respeito ao composto parental e a todos os metabolitos deste. Não confundir com "biodisponibilidade".

***Acumulação** (bioacumulação):* aumento ao longo do tempo da quantidade do produto químico presente nos tecidos (em geral tecidos adiposos, após exposição repetida). Se a quantidade do produto químico que penetra no corpo exceder a quantidade que dele é eliminada, o produto químico acumula-se no organismo e pode atingir concentrações tóxicas.

***ADME**:* acrónimo de "Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção".

***AUC** (área abaixo da curva de concentração no plasma em função do tempo):* área abaixo da curva que representa a evolução da concentração do produto químico no plasma ao longo do tempo. Corresponde à quantidade do produto químico absorvida pelo corpo num período determinado. Em condições de linearidade, esta área (do tempo zero a infinito) é proporcional à quantidade total do produto químico absorvida pelo corpo, independentemente da taxa de absorção.

***Autorradiografia** (autorradiografia de corpo inteiro):* esta técnica, que serve para determinar quantitativa e/ou qualitativamente a localização nos tecidos de um produto químico radioativo, utiliza películas de raios X ou, mais recentemente, recorre à imagiologia digital com placas fotoluminescentes para visualizar moléculas ou fragmentos de moléculas com marcação radioativa através do registo da radiação emitida no interior do objeto estudado. Comparativamente à dissecação de órgãos, a autorradiografia quantitativa de corpo inteiro pode apresentar algumas vantagens na determinação da distribuição do produto químico em estudo e na avaliação da resolução e da recuperação total das matérias radioativas nos tecidos. Uma vantagem significativa, por exemplo, é que esta técnica pode ser utilizada num modelo com animais pigmentados para avaliar a eventual associação do produto químico em estudo à melanina, que pode ligar-se a certas moléculas. Todavia, embora constitua um meio cómodo de visualizar globalmente os sítios de fixação de grande capacidade e baixa afinidade em todo o corpo, esta técnica pode ter limitações na identificação de sítios-alvo específicos como os da fixação ao recetor, cuja deteção exige resolução e sensibilidade relativamente elevadas. Quando se recorre à autorradiografia, as experiências destinadas a estabelecer o balanço de massas do composto administrado devem realizar-se num grupo ou estudo distintos, separadamente do estudo da distribuição pelos tecidos, procedendo-se à homogeneização de todas as excreções (incluindo, eventualmente, o ar expirado) e das carcaças completas e à análise das mesmas por contagem da cintilação em fase líquida.

***Excreção biliar**:* excreção pelas vias biliares.

***Bioacumulação**:* ver "acumulação".

***Biodisponibilidade**:* fração de uma dose administrada que atinge a circulação sistémica ou é disponibilizada no sítio da atividade fisiológica. Em geral, a biodisponibilidade de um produto químico refere-se ao composto parental, mas pode igualmente referir-se a metabolitos deste. Diz respeito apenas a uma forma química. *Nota importante*: biodisponibilidade e absorção não são sinónimos. A diferença entre, por exemplo, a absorção oral (isto é, presença na parede intestinal e na circulação portal) e a biodisponibilidade (isto é, presença no sangue sistémico e nos tecidos) pode, entre outros fatores, advir da degradação química devida ao metabolismo da parede intestinal, ao efluxo para o lúmen intestinal ou ao metabolismo pré-sistémico no fígado (10). A biodisponibilidade do componente tóxico (composto parental ou metabolito) é um parâmetro essencial na avaliação dos riscos para a saúde humana (extrapolação de doses elevadas para doses baixas, extrapolação de uma via para outra) para a determinação do valor interno correspondente a um NOAEL (nível sem observação de efeitos adversos) externo ou a uma dose de referência externa (dose aplicada). Para estudar os efeitos no fígado em caso de administração oral, é suficiente a absorção oral. Todavia, para estudar efeitos não localizados na porta de entrada, a biodisponibilidade é geralmente um parâmetro mais fiável para a avaliação dos riscos do que a absorção.

***Biopersistência**:* ver "persistência".

***Biotransformação**:* conversão química (geralmente enzimática) no corpo do produto químico em causa num produto químico diferente. É sinónimo de "metabolismo".

▼M4

C_{max}: concentração máxima (pico de concentração) no sangue (plasma/soro) após a administração ou excreção máxima (pico de excreção urinária ou fecal) após a administração.

Velocidade de eliminação: medição quantitativa da taxa, por unidade de tempo, à qual o produto químico em estudo é removido do sangue, do plasma ou de determinado tecido.

Compartimento: porção (ou unidade) estrutural ou bioquímica de um corpo, tecido ou célula separada do resto do corpo, do resto do tecido ou do resto da célula.

Vias de desintoxicação: séries de etapas conducentes à eliminação de produtos químicos tóxicos do corpo, seja por transformação metabólica seja por excreção.

Distribuição: dispersão de um produto químico e dos seus derivados num organismo.

Enzimas/isozimas: proteínas que catalisam reações químicas. As isozimas são enzimas que catalisam reações químicas semelhantes, mas diferem na sequência de aminoácidos.

Parâmetros enzimáticos: K_m, constante de Michaelis; e V_{max}, velocidade máxima.

Excreção: processo ou processos através dos quais um produto químico administrado e/ou os metabolitos deste são eliminados do corpo.

Exógeno: de origem exterior ao organismo ou sistema ou produzido fora dele.

Extrapolação: inferência de um ou mais valores desconhecidos com base no que é conhecido ou se observou.

Meia vida ($t_{1/2}$): tempo necessário para que a concentração do produto químico em estudo num compartimento diminua para metade. Refere-se geralmente à concentração no plasma ou à quantidade do produto químico em estudo presente em todo o corpo.

Indução/Indução enzimática: síntese de enzimas em resposta a um estímulo ambiental ou a uma molécula indutora.

Linearidade/Cinética linear: um processo diz-se de cinética "linear" se todas as transferências entre compartimentos forem proporcionais às quantidades ou concentrações presentes, isto é, forem de primeira ordem. Os volumes de eliminação e de distribuição, bem como as meias-vidas, são, portanto, constantes. As concentrações atingidas são proporcionais à dose (exposição) e a acumulação é mais facilmente previsível. Pode aferir-se da linearidade/não linearidade comparando os parâmetros pertinentes — por exemplo, a área abaixo da curva — após doses diferentes ou após uma exposição única e repetidas exposições. A inexistência de uma dependência da dose pode indicar a saturação das enzimas que intervêm no metabolismo do composto em causa; o aumento da área abaixo da curva após exposição repetida, comparativamente a uma exposição única, pode indicar inibição metabólica; a diminuição da área abaixo da curva pode indicar indução metabólica (ver também a referência 11).

▼M4

***Balanço de massas**:* contabilidade das entradas e saídas do sistema do produto químico em estudo.

***Balanço material**:* ver "balanço de massas".

***Mecanismo (modo) de toxicidade/Mecanismo (modo) de ação**:* o mecanismo de ação refere-se às interações bioquímicas específicas através das quais o produto químico em estudo produz os seus efeitos. O modo de ação refere-se aos fenómenos mais gerais através dos quais se manifesta a toxicidade do produto químico.

***Metabolismo**:* é sinónimo de "biotransformação".

***Metabolitos**:* produtos do metabolismo ou de processos metabólicos.

***Absorção oral**:* percentagem da dose do produto químico em estudo absorvida a partir do sítio de administração (trato gastrointestinal). Este parâmetro essencial pode servir para compreender que fração do produto químico administrado atinge a veia porta e, a seguir, o fígado.

***Coeficiente de partição**:* também conhecido por "coeficiente de distribuição", mede a diferença de solubilidades do produto químico em dois solventes.

***Níveis sanguíneos (plasmático/sérico) máximos**:* concentração máxima (pico de concentração) no sangue (plasma/soro) após a administração do produto químico (ver também "C_{max}").

***Persistência (biopersistência)**:* presença duradoura de um produto químico (num sistema biológico) devido a resistência deste à degradação/eliminação.

***Interpolação**:* utilização dos dados relativos a um determinado parâmetro disponíveis para um ou mais produtos químicos na previsão do resultado referente ao mesmo parâmetro para o produto químico em estudo.

***Autorradiografia microscópica dos recetores** (ou microautorradiografia dos recetores):* técnica que pode servir para estudar interações xenobióticas com determinados sítios de tecidos ou populações celulares, por exemplo, em estudos de fixação ao recetor ou de modo de ação específico que possam necessitar de resolução e sensibilidade elevadas, impossíveis de obter por técnicas como a autorradiografia de corpo inteiro.

***Via de administração** (oral, intravenosa, dérmica, inalatória, etc.):* refere-se aos meios pelos quais os produtos químicos são administrados ao corpo (por exemplo, por via oral através de sonda esofágica, por via oral através da dieta, por via dérmica, por inalação, por via intravenosa, etc.).

***Saturação**:* estado no qual um ou mais processos cinéticos (por exemplo, a absorção, o metabolismo ou a eliminação) estão no máximo (ou seja, saturados).

***Sensibilidade**:* capacidade de um método ou de um instrumento de distinguir medições correspondentes a níveis diferentes de resposta da variável em causa.

***Estado estacionário dos níveis sanguíneos (plasmáticos)**:* estado fora do equilíbrio de um sistema aberto no qual todas as forças exercidas no sistema são exatamente contrabalançadas por forças opostas, de maneira que todos os componentes do sistema têm uma concentração estacionária, embora fluam matérias pelo sistema.

***Modelação sistémica** (modelo toxicocinético de base fisiológica, modelo de base farmacocinética, modelo farmacocinético de base fisiológica, modelo de base biológica, etc.):* modelo abstrato que utiliza linguagem matemática para descrever o comportamento de um sistema.

***Tecidos-alvo**:* tecido no qual se manifesta o principal efeito adverso do produto tóxico.

▼**M4**

***Produto químico em estudo**:* qualquer produto químico ou mistura ao qual seja aplicado este método de ensaio.

***Distribuição nos tecidos**:* circulação reversível do produto químico em estudo de um ponto para outro do corpo. Esta distribuição pode estudar-se por dissecação, homogeneização, combustão ou contagem da cintilação em fase líquida dos órgãos ou por autorradiografia qualitativa e/ou quantitativa de corpo inteiro. A primeira via é útil para determinar concentrações e percentagens de recuperação em tecidos e na restante carcaça de um animal, mas pode não ter resolução suficiente em todos os tecidos e a recuperação global pode não ser a ideal (< 90 %). Ver abaixo a definição da outra via.

T_{max}*:* tempo necessário para atingir C_{max}.

***Toxicocinética** (farmacocinética):* Estudo de absorção, da distribuição, do metabolismo e da excreção de produtos químicos ao longo do tempo.

***Validação de modelos**:* processo de avaliar se um modelo descreve convenientemente os dados toxicocinéticos disponíveis. Pode avaliar-se modelos por comparação estatística ou visual, com valores experimentais, das previsões que permitem fazer, em função de uma variável independente comum (por exemplo, o tempo). A amplitude da avaliação deve ser compatível com a utilização pretendida do modelo.

▼B

B.37. NEUROTOXICIDADE RETARDADA DE SUBSTÂNCIAS ORGANOFOSFORADAS POR EXPOSIÇÃO AGUDA

1. MÉTODO

1.1. INTRODUÇÃO

Na determinação e avaliação dos efeitos tóxicos das substâncias deve ter-se em conta o potencial de certos grupos, de determinarem tipos específicos de neurotoxicidade não detectáveis noutros ensaios de toxicidade. Verifica-se, assim, que algumas substâncias organofosforadas induzem neurotoxicidade retardada, constituindo potenciais alvos para avaliação.

Os ensaios de rastreio *in vitro* podem ser utilizados para identificar substâncias susceptíveis de induzir polineuropatias retardadas; todavia, a obtenção de resultados negativos nos ensaios *in vitro* não comprova que as referidas substâncias não possuem efeitos neurotóxicos.

Ver a parte B da Introdução Geral.

1.2. DEFINIÇÕES

As *substâncias organofosforadas* incluem os ésteres, tioésteres e anidridos não ionizados de ácidos organofosfóricos, organofosfónicos e organofosforamídicos ou de ácidos fosforotióicos, fosfonotióicos e fosforotioamídicos afins, bem como quaisquer outras substâncias que possam causar o tipo de neurotoxicidade retardada que se observa por vezes nas referidas classes de substâncias.

Neurotoxicidade retardada é o síndroma associado à manifestação retardada de ataxia e de axonopatias distais na espinal medula e nos nervos periféricos, bem como à inibição e à redução da actividade da esterase envolvida na neuropatia, presente no tecido nervoso.

1.3. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

Pode utilizar-se uma substância de referência com um lote de controlo positivo, de modo a demonstrar que, nas condições de ensaio, não existe uma alteração significativa da reacção da espécie em causa.

O fosfato de tris-*o*-tolilo [n.º CAS: 78-30-8; n.º EINECS: 201-103-5; designado éster tris (2-metilfe-nílico) do ácido fosfórico na nomenclatura CAS e também conhecido por fosfato de tris-*o*-cresilo] constitui uma substância neurotóxica largamente utilizada.

1.4. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

A substância em estudo é administrada por via oral, numa única dose, a galinhas domésticas eventualmente protegidas de efeitos colinérgicos agudos. Os animais são observados durante 21 dias, registando-se a manifestação de quaisquer perturbações do comportamento, bem como de ataxia e paralisia. As determinações bioquímicas, nomeadamente da inibição da esterase envolvida na neuropatia, são efectuadas com aves seleccionadas de modo aleatório em cada lote, em geral 24 e 48 horas após a administração. 21 dias após a exposição, procede-se ao abate dos restantes animais, seguido do exame histopatológico de determinados tecidos do sistema nervoso.

▼B

1.5. DESCRIÇÃO DO MÉTODO

1.5.1. **Preparação**

Seleccionam-se de modo aleatório galinhas adultas, jovens e saudáveis, isentas de afecções virais e medicação concomitantes, bem como de anomalias da marcha, que se repartem pelos lotes de ensaio e de controlo. Os animais são aclimatados às condições de laboratório durante pelo menos cinco dias antes do início do ensaio.

Devem utilizar-se gaiolas ou recintos cujas dimensões permitam a livre mobilidade das aves e a fácil observação da respectiva marcha.

A substância em estudo é administrada por via oral, por intermédio de uma sonda gástrica, de cápsulas de gelatina ou de um método comparável. Os líquidos podem ser administrados sem diluição ou dissolvidos num veículo adequado, nomeadamente óleo de milho; os sólidos devem ser dissolvidos sempre que possível, uma vez que a absorção de doses elevadas de sólidos dispersos em cápsulas de gelatina poderá não ser eficaz. No caso de se utilizar um veículo não aquoso, devem conhecer-se, ou determinar-se antes do ensaio, as respectivas características de toxicidade.

1.5.2. **Condições de ensaio**

1.5.2.1. *Animais de ensaio*

Recomenda-se a utilização de galinhas poedeiras, adultas e jovens (*Gallus gallus domesticus*), com idades compreendidas entre 8 e 12 meses. Devem utilizar-se raças e variedades correntes, mantendo-se os animais em condições que permitam a sua livre mobilidade.

1.5.2.2. *Número e sexo*

Além do lote de ensaio, devem utilizar-se um lote de controlo com o veículo e um lote de controlo positivo. Os animais incluídos no lote de controlo com o veículo devem ser tratados de modo análogo aos animais do lote de ensaio, omitindo-se apenas a administração da substância em estudo.

Deve utilizar-se um número suficiente de animais em cada lote, de modo a que possam ser abatidos pelo menos seis animais para as determinações bioquímicas (três em dois momentos diferentes), sobrevivendo seis para o período de observação de 21 dias.

Pode efectuar-se um controlo positivo em paralelo ou, como alternativa, utilizar dados obtidos em controlos positivos anteriores. O lote de controlo positivo deve ser constituído por um mínimo de seis aves a que se administra uma substância com actividade neurotóxica retardada conhecida, destinando-se três animais às determinações bioquímicas e os restantes a observação. Recomenda-se a actualização periódica dos dados obtidos. Caso um laboratório altere algum elemento essencial do protocolo experimental (por exemplo, variedade de animais utilizada, condições de alimentação ou alojamento), deve efectuar-se novo controlo positivo.

▼B

1.5.2.3. *Doses*

Para estabelecer a dose a utilizar no ensaio, deve realizar-se um estudo prévio com um número adequado de aves e de doses, que poderá implicar a morte de alguns animais. Todavia, de modo a evitar a mortalidade devida a efeitos colinérgicos agudos, pode utilizar-se atropina ou outro agente protector que se saiba não interferir com as reacções neurotóxicas retardadas. Na estimativa da dose máxima não letal da substância em estudo podem utilizar-se diversos métodos de ensaio (ver o método B.1.*bis*).

A dose de substância em estudo a utilizar no ensaio deve ser tão elevada quanto possível, em função dos resultados do estudo prévio de selecção, não excedendo 2 000 mg/kg de massa corporal. O número de animais mortos durante o ensaio não deve interferir com o número mínimo de animais a utilizar para as determinações bioquímicas e para o exame histopatológico a 21 dias (seis em ambos os casos). De modo a evitar a mortalidade devida a efeitos colinérgicos agudos, pode utilizar-se atropina ou outro agente protector que se saiba não interferir com as reacções neurotóxicas retardadas.

1.5.2.4. *Ensaio-limite*

Sempre que um ensaio, realizado de acordo com o presente método, que utilize uma dose de, pelo menos, 2 000 mg/kg de massa corporal/dia, não produza efeitos tóxicos observáveis, ou se, tendo em conta dados referentes a substâncias estruturalmente afins, não se preveja o surgimento de efeitos tóxicos, poderá não ser necessário efectuar um ensaio com uma dose mais elevada. Nestes casos, justifica-se a realização de um ensaio-limite, excepto se a exposição humana indicar a necessidade de recurso a uma dose superior.

1.5.2.5. **Período de observação**

O período de observação deve ser de 21 dias.

1.5.3 **Procedimento**

Após a administração de um agente destinado a evitar a mortalidade devida a efeitos colinérgicos agudos, administra-se a substância em estudo numa única dose.

1.5.3.1. *Observações gerais*

Devem iniciar-se as observações logo após a administração da substância. Os animais devem ser cuidadosamente observados várias vezes nos dois dias subsequentes à administração e pelo menos diariamente até perfazer o período de 21 dias ou até ao abate previsto. Devem registar-se todos os sinais de toxicidade, incluindo o momento da manifestação, o tipo, a gravidade e a duração das anomalias de comportamento. A ataxia deve determinar-se de acordo com uma escala numérica constituída por um mínimo de quatro níveis, devendo também registar-se os casos de paralisia. Pelo menos duas vezes por semana, devem retirar-se das gaiolas os animais seleccionados para observação patológica, submetendo-os a um período de actividade motora forçada, nomeadamente a subida de uma escada, de modo a facilitar a observação de efeitos tóxicos mínimos. Os animais moribundos, bem como aqueles que mostrem sinais de dor e sofrimento intensos, devem ser removidos, abatidos por intervenção humana e autopsiados.

▼B

1.5.3.2. *Massa corporal*

As aves devem ser pesadas imediatamente antes da administração da substância em estudo e, pelo menos, uma vez por semana na sequência da mesma.

1.5.3.3. *Determinações bioquímicas*

Alguns dias após a administração da substância, devem abater-se seis aves seleccionadas de modo aleatório dos lotes de ensaio e de controlo com o veículo, bem como três aves do lote de controlo positivo (caso este último seja efectuado em paralelo), preparando-se os respectivos cérebros e espinais medulas com vista a determinar a inibição da actividade da esterase envolvida na neuropatia. Além disso, pode também revelar-se útil preparar, para o mesmo fim, tecidos provenientes dos nervos ciáticos. Em geral, abatem-se três animais do lote de controlo e de cada lote de ensaio 24 horas após a administração da substância e três 48 horas após a mesma; os três animais dos lotes de controlo positivos devem ser abatidos 24 horas após a administração. Caso os sinais clínicos de intoxicação (que pode ser avaliada em função do momento da manifestação dos efeitos colinérgicos) observados indicarem que o agente tóxico é eliminado de forma bastante lenta, poderá ser preferível recolher tecidos de três animais em dois momentos compreendidos entre 24 horas e, no máximo, 72 horas após a administração.

Se for caso disso, podem também efectuar-se determinações de acetilcolinesterase com as amostras em causa. Todavia, a possível ocorrência *in vivo* de reactivação espontânea da mesma poderá levar a subestimar a capacidade de inibição da acetilcolinesterase da substância em estudo.

1.5.3.4. *Autópsia*

A autópsia dos animais abatidos (abates previstos e abates de animais moribundos) deve incluir o exame macroscópico do cérebro e da espinal-medula.

1.5.3.5. *Exame histopatológico*

O tecido nervoso dos animais sobreviventes após o período de observação, que não for utilizado para as determinações bioquímicas deve ser objecto de exame microscópico. Os tecidos devem ser fixados *in situ*, por recurso a técnicas de perfusão. As secções a examinar incluem o cerebelo (ao nível meio-longitudinal), a *medulla oblongata*, a espinal medula e os nervos periféricos. Devem recolher-se secções da espinal medula provenientes do segmente cervical superior e das regiões mediotorácica e lombo-sagrada. Devem também recolher-se secções provenientes da região distal do nervo tibial e das respectivas ramificações para o músculo gastroenémio, bem como do nervo ciático. As secções em causa devem ser coradas com corantes adequados à mielina e corantes específicos dos axónios.

2. **DADOS**

A obtenção de resultados negativos para os parâmetros bioquímicos, histopatológicos e de comportamento investigados no âmbito do presente ensaio não implica, de modo geral, a realização de ensaios complementares de neurotoxicidade retardada. A obtenção de resultados duvidosos ou não conclusivos poderá requerer a realização de estudos complementares.

Devem registar-se os dados relativos a cada animal. Além disso, todos os dados devem ser resumidos num quadro, referindo-se, para cada lote de ensaio, o número de animais utilizados, o número de animais que apresentam lesões e alterações de comportamento ou dos parâmetros bioquímicos, bem como o tipo e a gravidade das referidas lesões, e a percentagem de animais que apresentam cada tipo de lesões e alterações, em função da respectiva gravidade.

▼B

Os resultados do ensaio devem ser avaliados em termos de incidência, gravidade e correlação das alterações de comportamento, bem como dos efeitos bioquímicos, histopatológicos e outros efeitos observados nos lotes de ensaio e de controlo.

Sempre que possível, os resultados numéricos devem ser avaliados por recurso a um método estatístico de aceitação geral, cuja escolha deve ser efectuada na fase de concepção do ensaio.

3. **RELATÓRIO**

RELATÓRIO DO ENSAIO

O relatório do ensaio deve incluir, sempre que possível, as seguintes informações:

3.1. Animais utilizados no ensaio:

— estirpe utilizada;

— número e idade dos animais;

— proveniência, condições de alojamento, etc.;

— massa de cada animal no início do ensaio.

3.2. Condições de ensaio:

— pormenores relativos à preparação da substância em estudo e à respectiva estabilidade e homogeneidade, se for caso disso;

— justificação da escolha do veículo;

— pormenores relativos à administração da substância em estudo;

— pormenores relativos à qualidade dos alimentos e da água;

— motivo da selecção da dose utilizada;

— especificação das doses administradas, incluindo pormenores relativos ao veículo, bem como ao volume utilizado e às características físicas da substância administrada;

— identidade do agente protector eventualmente utilizado e pormenores relativos à respectiva administração.

3.3. Resultados:

— dados relativos à massa corporal;

— consumo de alimentos e de água, se for caso disso;

— reacções tóxicas observadas em cada lote, incluindo a mortalidade;

— natureza, gravidade e duração dos sinais clínicos (reversíveis ou não);

— descrição pormenorizada dos ensaios bioquímicos realizados e respectivos resultados;

— dados obtidos por autópsia;

— descrição pormenorizada dos resultados do exame histopatológico;

— tratamento estatístico dos resultados, se for caso disso.

Discussão dos resultados.

Conclusões.

4. **REFERÊNCIAS**

O presente método é análogo ao método OCDE TG 418.

▼B

B.38. **NEUROTOXICIDADE RETARDADA DE SUBSTÂNCIAS ORGANOFOSFORADAS POR ADMINISTRAÇÃO REPETIDA A 28 DIAS**

1. **MÉTODO**

1.1. INTRODUÇÃO

Na determinação e avaliação dos efeitos tóxicos das substâncias deve ter-se em conta o potencial de certas classes das mesmas de determinarem tipos específicos de neurotoxicidade não detectáveis noutros ensaios de toxicidade. Verifica-se, assim, que algumas substâncias organofosforadas induzem neurotoxicidade retardada, constituindo potenciais alvos para avaliação.

Os ensaios de rastreio *in vitro* podem ser utilizados para identificar substâncias susceptíveis de induzir polineuropatias retardadas; todavia, a obtenção de resultados negativos nos ensaios *in vitro* não comprova que as referidas substâncias não possuem efeitos neurotóxicos.

O presente ensaio de toxicidade retardada a 28 dias fornece informações sobre os eventuais riscos para a saúde decorrentes da exposição repetida num período limitado, nomeadamente a relação dose administrada-efeito, bem como uma estimativa das doses sem efeitos observados, a utilizar no estabelecimento de critérios de segurança na exposição à substância.

Ver a parte B da Introdução Geral.

1.2. DEFINIÇÕES

As *substâncias organofosforadas* incluem os ésteres, tioésteres e anidridos não ionizados de ácidos organofosfóricos, organofosfónicos e organofosforamídicos ou de ácidos fosforotióicos, fosfonotióicos e fosforotioamídicos afins, bem como quaisquer outras substâncias que possam causar o tipo de neurotoxicidade retardada que se observa por vezes nas referidas classes de substâncias.

Neurotoxicidade retardada é a síndrome associada à manifestação retardada de ataxia e de axonopatias distais na espinal medula e nos nervos periféricos, bem como à inibição e a redução da actividade da esterase envolvida na neuropatia, presente no tecido nervoso.

1.3. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

A substância em estudo é administrada por via oral a galinhas domésticas, durante 28 dias. Os animais são observados pelo menos diariamente, registando-se a manifestação de quaisquer perturbações do comportamento, bem como de ataxia e paralisia, até 14 dias após a administração da última dose. As determinações bioquímicas, nomeadamente da inibição da esterase envolvida na neuropatia, são efectuadas com aves seleccionadas de modo aleatório em cada lote, em geral 24 e 48 horas após a administração da última dose. Duas semanas após esta última, procede-se ao abate dos restantes animais, seguido do exame histopatológico de determinados tecidos do sistema nervoso.

▼B

1.4. DESCRIÇÃO DO MÉTODO

1.4.1. **Preparação**

Seleccionam-se de modo aleatório galinhas adultas, jovens e saudáveis, isentas de afecções virais e medicação concomitantes, bem como de anomalias da marcha, que se repartem pelos lotes de ensaio e de controlo. Os animais são aclimatados às condições de laboratório durante pelo menos cinco dias antes do início do ensaio.

Devem utilizar-se gaiolas ou recintos cujas dimensões permitam a livre mobilidade das aves e a fácil observação da respectiva marcha.

A substância em estudo é administrada por via oral, por intermédio de uma sonda gástrica, de cápsulas de gelatina ou de um método comparável. Os líquidos podem ser administrados sem diluição ou dissolvidos num veículo adequado, nomeadamente óleo de milho; os sólidos devem ser dissolvidos sempre que possível, uma vez que a absorção de doses elevadas de sólidos dispersos em cápsulas de gelatina poderá não ser eficaz. No caso de se utilizar um veículo não aquoso, devem conhecer-se, ou determinar-se antes do ensaio, as respectivas características de toxicidade.

1.4.2. **Condições de ensaio**

1.4.2.1. *Animais de ensaio*

Recomenda-se a utilização de galinhas poedeiras, adultas e jovens (*Gallus gallus domesticus*), com idade compreendida entre 8 e 12 meses. Devem utilizar-se raças e variedades correntes, mantendo-se os animais em condições que permitam a sua livre mobilidade.

1.4.2.2. *Número e sexo*

Devem utilizar-se pelo menos três lotes de ensaio e um lote de controlo com o veículo. Os animais incluídos no lote de controlo com o veículo devem ser tratados de modo análogo aos animais do lote de ensaio, omitindo-se apenas a administração da substância em estudo.

Deve utilizar-se um número suficiente de animais em cada lote, de modo a que possam ser abatidos pelo menos seis animais para as determinações bioquímicas (três em dois momentos diferentes), sobrevivendo seis para o período de observação de 14 dias após a administração da última dose.

1.4.2.3. *Doses*

Na selecção das doses devem ter-se em conta os resultados dos ensaios de neurotoxicidade retardada por administração aguda, bem como quaisquer outros dados disponíveis em matéria de toxicidade e cinética referentes à substância em causa. A dose mais elevada deve ser escolhida com o objectivo de induzir efeitos tóxicos, nomeadamente de neurotoxicidade retardada, evitando contudo a morte e o sofrimento intenso. Posteriormente, deve seleccionar-se uma sequência decrescente de doses, com o objectivo de evidenciar uma correlação entre a dose administrada e a reacção observada, bem como a ausência de efeitos nocivos associados à administração da dose mais reduzida.

▼B

1.4.2.4. *Ensaio-limite*

Sempre que um ensaio, realizado de acordo com o presente método, que utilize uma dose de, pelo menos, 1 000 mg/kg de massa corporal/dia, não produza efeitos tóxicos observáveis, ou se, tendo em conta dados referentes a substâncias estruturalmente afins, não se preveja a manifestação de efeitos tóxicos, poderá não ser necessário efectuar um ensaio com uma dose mais elevada. Nestes casos, justifica-se a realização de um ensaio-limite, excepto se a exposição humana indicar a necessidade de recurso a uma dose superior.

1.4.2.5. *Período de observação*

Os animais devem ser observados com uma frequência pelo menos diária no decurso do período de exposição e nos 14 dias subsequentes à administração da última dose, salvo no caso de se proceder a autópsias intermédias.

1.4.3. **Procedimento**

Deve administrar-se a substância aos animais sete dias por semana, num período de 28 dias.

1.4.3.1. *Observações gerais*

Devem iniciar-se as observações logo após a administração da primeira dose. Os animais devem ser cuidadosamente observados com uma frequência diária mínima, no decurso do período de exposição e nos 14 dias subsequentes à administração da última dose, ou até ao abate previsto. As observações devem incluir, nomeadamente, as anomalias de comportamento. A ataxia deve determinar-se de acordo com uma escala numérica constituída por um mínimo de quatro níveis, devendo também registar-se os casos de paralisia. Pelo menos duas vezes por semana, devem retirar-se das gaiolas os animais seleccionados para observação patológica, submetendo-os a um período de actividade motora forçada, nomeadamente a subida de uma escada, de modo a facilitar a observação de efeitos tóxicos mínimos. Os animais moribundos, bem como aqueles que mostrem sinais de dor e sofrimento intensos, devem ser removidos, abatidos por intervenção humana e autopsiados.

1.4.3.2. *Massa corporal*

As aves devem ser pesadas imediatamente antes da administração da primeira dose e, pelo menos, uma vez por semana na sequência da mesma.

1.4.3.3. *Determinações bioquímicas*

Alguns dias após a administração da última dose, devem abater-se seis aves seleccionadas de modo aleatório dos lotes de ensaio e de controlo com o veículo, preparando-se os respectivos cérebros e espinais medulas com vista a determinar a inibição da actividade da esterase envolvida na neuropatia. Além disso, pode também revelar-se útil preparar, para o mesmo fim, tecidos provenientes dos nervos ciáticos. Em geral, abatem-se três animais do lote de controlo e de cada lote de ensaio 24 horas após a administração da última dose e três 48 horas após a mesma. Podem utilizar-se outros intervalos de abate, apresentando a respectiva justificação, caso os dados provenientes de ensaios de toxicidade aguda ou de outro tipo de estudos (nomeadamente de toxicocinética) mostrem que esses intervalos são mais adequados.

Se for caso disso, podem também efectuar-se determinações de acetilcolinesterase com as amostras em causa. Todavia, a possível ocorrência *in vivo* de reactivação espontânea da mesma poderá levar a subestimar a capacidade de inibição da acetilcolinesterase da substância em estudo.

▼B

1.4.3.4. *Autópsia*

A autópsia dos animais abatidos (abates previstos e abates de animais moribundos) deve incluir o exame macroscópico do cérebro e da espinal medula.

1.4.3.5. *Exame histopatológico*

O tecido nervoso dos animais sobreviventes após o período de observação que não for utilizado para as determinações bioquímicas deve ser objecto de exame microscópico. Os tecidos devem ser fixados *in situ,* por recurso a técnicas de perfusão. As secções a examinar incluem o cerebelo (ao nível meio-longitudinal), a *medulla oblongata,* a espinal medula e os nervos periféricos. Devem recolher-se secções da espinal medula provenientes do segmento cervical superior e das regiões médio-torácica e lombo-sagrada. Devem também recolher-se secções provenientes da região distal do nervo tibial e das respectivas ramificações para o músculo gastroenémio, bem como do nervo ciático. As secções em causa devem ser coradas com corantes adequados à mielina e corantes específicos dos axónios. Inicialmente, o exame microscópico deve abranger apenas os tecidos conservados dos animais do lote de controlo e do lote a que foi administrada a dose mais elevada; se, neste último caso, se observarem efeitos tóxicos, deve efectuar-se também o exame microscópico dos tecidos provenientes dos animais dos lotes a que foram administradas doses reduzidas e intermédias.

2. **DADOS**

A obtenção de resultados negativos para os parâmetros bioquímicos, histopatológicos e de comportamento investigados no âmbito do presente ensaio não implica, de modo geral, a realização de ensaios complementares de neurotoxicidade retardada. A obtenção de resultados duvidosos ou não conclusivos poderá requerer a realização de estudos complementares.

Devem registar-se os dados relativos a cada animal. Além disso, todos os dados devem ser resumidos num quadro, referindo-se, para cada lote de ensaio, o número de animais utilizados, o número de animais que apresentem lesões e alterações de comportamento ou dos parâmetros bioquímicos, bem como o tipo e a gravidade das referidas lesões, e a percentagem de animais que apresentam cada tipo de lesões e alterações, em função da respectiva gravidade.

Os resultados do ensaio devem ser avaliados em termos de incidência, gravidade e correlação das alterações de comportamento, bem como dos efeitos bioquímicos, histopatológicos e outros efeitos observados nos lotes de ensaio e de controlo.

Sempre que possível, os resultados numéricos devem ser avaliados por recurso a um método estatístico de aceitação geral, cuja escolha deve ser efectuada na fase de concepção do ensaio.

3. **RELATÓRIO**

RELATÓRIO DO ENSAIO

O relatório do ensaio deve incluir, sempre que possível, as seguintes informações:

3.1. Animais utilizados no ensaio:

— estirpe utilizada;

— número e idade dos animais;

— proveniência, condições de alojamento, etc.;

— massa de cada animal no início do ensaio.

▼B

3.2. Condições de ensaio:

— pormenores relativos à preparação da substância em estudo e à respectiva estabilidade e homogeneidade, se for caso disso;

— justificação da escolha do veículo;

— pormenores relativos à administração da substância em estudo;

— pormenores relativos à qualidade dos alimentos e da água;

— motivo da selecção das doses utilizadas;

— especificação das doses administradas, incluindo pormenores relativos ao veículo, bem como ao volume utilizado e às características físicas da substância administrada;

— motivos da selecção de outros intervalos para as determinações bioquímicas que não 24 ou 48 horas após a administração da última dose.

3.3. Resultados:

— dados relativos à massa corporal;

— reacções tóxicas observadas por dose administrada, incluindo a mortalidade;

— nível sem efeitos adversos observáveis;

— natureza, gravidade e duração dos sinais clínicos (reversíveis ou não);

— descrição pormenorizada dos ensaios bioquímicos realizados e respectivos resultados;

— dados obtidos por autópsia;

— descrição pormenorizada dos resultados do exame histopatológico;

— tratamento estatístico dos resultados, se for caso disso.

Discussão dos resultados.

Conclusões.

4. **REFERÊNCIAS**

O presente método é análogo ao método OCDE TG 419.

▼B

B.39. ENSAIO *IN VIVO* DA SÍNTESE NÃO PROGRAMADA (UDS) DE ADN EM CÉLULAS DO FÍGADO DE MAMÍFEROS

1. MÉTODO

O presente método é idêntico ao método OCDE TB 486 — Ensaio *in vivo* da síntese não programada (UDS) de ADN em células do fígado de mamíferos (1997).

1.1. INTRODUÇÃO

O objectivo do ensaio *in vivo* da síntese não programada (UDS) de ADN em células do fígado de mamíferos é identificar as substâncias que induzem a reparação do ADN nas células do fígado de animais expostos à substância em estudo (1) (2) (3) (4).

O presente ensaio *in vivo* apresenta um método para investigação dos efeitos dos produtos químicos genotóxicos sobre o fígado. O valor limite medido é indicativo dos danos e da subsequente reparação do ADN em células do fígado. O fígado é geralmente o local principal de metabolização dos compostos absorvidos, pelo que é particularmente apropriado para avaliar os danos do ADN *in vivo*.

Se existirem provas de que nem a substância em estudo nem nenhum dos seus metabolitos reactivos entram em contacto com o tecido objectivo, o presente ensaio não é apropriado.

O ponto final da síntese não programada (UDS) de ADN é medido através da determinação da incorporação de nucleótidos marcados por células que não se encontram numa fase de síntese programada de ADN (fase S). A técnica mais utilizada é a determinação da incorporação de timidina marcada com trítio (^{3}H-TdR) por autoradiografia. Nos ensaios UDS *in vivo* são geralmente utilizados fígados de rato. Podem também ser utilizados outros tecidos, mas não é esse o objectivo do presente método.

A detecção de uma resposta UDS depende do número de bases do ADN excizadas e substituídas no local danificado. Por conseguinte, o ensaio UDS é particularmente válido para a detecção de «reparação de cadeias longas» (20-30 bases) induzida pela substância. A «reparação de cadeias curtas» (1-3 bases) é, pelo contrário, detectada com uma sensibilidade muito mais baixa. Além disso, podem existir eventos mutagénicos decorrentes da não reparação, reparação incorrecta ou de problemas de replicação das lesões do ADN. A extensão da resposta UDS não dá qualquer indicação em relação à fidelidade do processo de reparação. Além disso, é possível que um agente mutagéneo reaja com o ADN mas que os danos do ADN não sejam posteriormente reparados através de um processo de reparação da excisão. A ausência de informação específica sobre a actividade mutagénica do ensaio UDS é compensada pela potencial sensibilidade do seu ponto final, uma vez que é medido na totalidade do genoma.

Ver também a parte B da Introdução Geral.

1.2. DEFINIÇÕES

Células em reparação: apresentam uma granulação nuclear líquida (NNG) superior a um valor pré-determinado, a justificar pelo laboratório que conduz o ensaio.

Granulação nuclear líquida (NNG): medida quantitativa da actividade celular UDS em ensaios autoradiográficos UDS, calculada pela subtracção do número médio de grânulos citoplásmicos em sectores citoplásmicos equivalentes ao núcleo (CG) ao número de grânulos nucleares (NG): NNG = NG — CG. As contagens NNG são calculadas para cada célula e são depois ponderadas para as células de uma cultura, em culturas paralelas, etc.

▼B

Síntese não programada (UDS) de ADN: síntese de reparação do ADN após excisão e remoção de uma sequência de ADN que contém uma região danificada por indução de substâncias químicas ou de agentes físicos.

1.3. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

O ensaio UDS *in vivo* em células do fígado de mamíferos indica a ocorrência de uma síntese de reparação do ADN após excisão e remoção de uma sequência de ADN que continha uma região danificada por indução de substâncias químicas ou de agentes físicos. O ensaio baseia-se geralmente na incorporação de ^{3}H-TdR no ADN de células do fígado com uma baixa proporção de células na fase S do ciclo celular. A incorporação de ^{3}H-TdR é geralmente determinada por autoradiografia, uma vez que esta técnica não é tão sensível à interferência das células em fase S como, por exemplo, a contagem de cintilação em meio líquido.

1.4. DESCRIÇÃO DO MÉTODO

1.4.1. **Preparação**

1.4.1.1. *Selecção das espécies animais*

Geralmente são utilizados ratos, embora possa ser utilizada qualquer outra espécie de mamífero apropriada. Devem ser utilizados animais adultos saudáveis jovens das raças de laboratório mais comuns. No início do estudo, a diferença de peso entre os animais deve ser mínima, não devendo exceder ± 20 % do peso médio de cada sexo.

1.4.1.2. *Condições de acomodação e alimentação*

Devem ser aplicadas as condições gerais referidas na Introdução Geral, parte B, embora o objectivo para a humidade deva ser de 50 %-60 %.

1.4.1.3. *Preparação dos animais*

Os animais adultos saudáveis jovens são distribuídos aleatoriamente pelos grupos de controlo e pelos grupos expostos. As gaiolas devem ser dispostas de modo a que eventuais efeitos devidos à respectiva colocação sejam minimizados. Os animais são identificados de forma inequívoca, devendo ser aclimatados às condições de laboratório durante pelo menos cinco dias antes de se iniciar o estudo.

1.4.1.4. *Preparação das doses*

As substâncias sólidas devem ser dissolvidas ou suspensas em solventes ou veículos adequados e, se necessário, diluídas antes de serem administradas aos animais. As substâncias líquidas podem ser adicionadas directamente aos sistemas em estudo e/ou diluídas antes de serem adicionadas às células. Devem ser utilizadas preparações frescas da substância em estudo, a menos que os dados de estabilidade demonstrem que o respectivo armazenamento não coloca problemas para o ensaio.

1.4.2. **Condições do ensaio**

1.4.2.1. *Solvente/veículo*

O solvente/veículo não deve reagir com a substância em estudo, não devendo produzir efeitos tóxicos nas doses utilizadas. Caso se utilizem solventes/veículos cujas propriedades não se encontrem totalmente elucidadas, devem fornecer-se dados que justifiquem a sua compatibilidade. Sempre que possível, recomenda-se a utilização de um solvente/veículo aquoso.

▼B

1.4.2.2. *Controlos*

Cada experiência deve incluir em paralelo controlos positivos e negativos (solvente/veículo). Com excepção da exposição à substância em estudo, todos os animais, incluindo os dos grupos de controlo, devem ser manuseados de forma idêntica.

Os controlos positivos devem ser substâncias comprovadamente causadoras de UDS quando administradas aos níveis de exposição a que se espera o surgimento de um aumento detectável em relação à linha de base. Os controlos positivos que exijam activação metabólica devem ser utilizados em doses que desencadeiem uma resposta moderada (4). A dose de controlo positiva a administrar deve ser escolhida de modo a que os seus efeitos sejam claros mas também a que as lâminas codificadas não sejam imediatamente identificadas pela pessoa que procede às leituras. As substâncias de controlo positivo podem incluir, por exemplo:

Tempo de amostragem	Substância	Número CAS	Número EINECS
Amostragens iniciais (2-4 horas)	N-nitrosodimetilamina	62-75-9	200-249-8
Amostragens finais (12-16 horas)	N-2-fluorenilacetamida (2-AAF)	53-96-3	200-188-6

Podem ser utilizadas outras substâncias de controlo positivo apropriadas. O controlo positivo pode ser administrado por uma via diferente da substância em estudo.

1.5. PROCEDIMENTO

1.5.1. **Número e sexo de animais**

Deve ser utilizado um número de animais suficiente para que a variação biológica natural seja tomada em consideração nos resultados do ensaio, com pelo menos três animais analisáveis por grupo. Se já existir uma base de dados históricos significativa, os grupos de controlo positivo e negativo poderão conter apenas um ou dois animais.

Se no momento do estudo existirem dados disponíveis de estudos com as mesmas espécies e com utilização da mesma via de administração que demonstrem que não há qualquer diferença substancial de toxicidade entre os sexos, será suficiente testar um único sexo, de preferência o sexo masculino. Nos casos em que a exposição humana aos produtos químicos possa ser específica a cada sexo, como acontece com alguns produtos farmacêuticos, o ensaio deve ser executado com animais do sexo em causa.

1.5.2. **Programação do tratamento**

As substâncias de ensaio são preferivelmente administradas numa única exposição.

1.5.3. **Doses**

Normalmente, são utilizadas pelo menos duas doses diferentes. A dose mais elevada é definida como a dose que produz sinais de toxicidade tais que indiquem que a utilização de doses superiores, com o mesmo regime de administração, produzirá mortalidade. Em termos gerais, a dose inferior deve ser de 25 %-50 % da dose mais elevada.

▼B

As substâncias com actividade biológica específica em doses baixas e não tóxicas (como acontece com as hormonas e agentes mitogénicos) poderão constituir uma excepção aos critérios de fixação da dose, devendo ser avaliadas caso a caso. Se for realizado um estudo para avaliação da gama de doses a administrar, por não estarem disponíveis dados apropriados, esse estudo deve ser executado no mesmo laboratório, utilizando as mesmas espécies, linha celular, sexo e regime de exposição a utilizar no estudo principal.

A dose mais elevada pode igualmente ser definida como uma dose que produz algumas indicações de toxicidade no fígado (por exemplo, núcleos picnóticos).

1.5.4. **Ensaio-limite**

Se um ensaio com uma dose de pelo menos 2 000 mg/kg de peso corporal numa única exposição ou em duas exposições no mesmo dia não produzir nenhum efeito tóxico perceptível e se não for previsível a existência de toxicidade genética com base nos dados respeitantes a substâncias estruturalmente relacionadas, poderá não ser considerado necessário um estudo completo. A exposição prevista para o ser humano pode indicar a necessidade de se utilizarem doses mais elevadas nos ensaios-limite.

1.5.5. **Administração das doses**

A substância em estudo é geralmente administrada por sonda esofágica, utilizando um tubo estomacal ou cânula de intubação apropriada. Poderão ser aceites, mediante justificação, outras vias de administração, mas a via intraperitoneal não é recomendada, uma vez que poderá expor o fígado à substância em estudo directamente e não através do sistema circulatório. O volume máximo de líquido que pode ser administrado de cada vez por sonda esofágica ou por injecção depende também do tamanho do animal de ensaio, não devendo exceder 2 ml/100 g de peso corporal. A utilização de volumes mais elevados deve ser justificada. Com excepção das substâncias que causem irritação ou que sejam corrosivas, cujos efeitos serão normalmente agravados em concentrações mais altas, a variabilidade do volume de ensaio deve ser minimizada através do ajustamento das concentrações, por forma a garantir um volume constante para todas as doses a administrar.

1.5.6. **Preparação das células de fígado**

As células do fígado são normalmente preparadas a partir dos animais expostos à substância em estudo 12-16 horas após a administração da substância em estudo. Geralmente será necessário realizar uma primeira amostra (normalmente 2-4 horas após a exposição), que só não terá de ser utilizada quando haja uma resposta positiva clara às 12-16 horas. Contudo, podem ser utilizados outros tempos de amostragem, desde que sejam justificados com base em dados toxicocinéticos.

As culturas celulares de curta duração do fígado de mamíferos são geralmente preparadas irrigando o fígado *in situ* com colagenase e deixando que algumas células livres separadas do fígado há pouco tempo se fixem a uma superfície apropriada. As células do fígado de animais do controlo negativo devem ter uma viabilidade de pelo menos 50 % (5).

1.5.7. **Determinação da UDS**

As células de fígado de mamífero isoladas há pouco tempo são geralmente incubadas num meio que contém ^{3}H-TdR durante um período adequado, por exemplo 3-8 horas. No final do período de incubação, as células são lavadas para remover o meio residual e depois incubadas num meio com excesso de timidina não rotulada para diminuir a radioactividade não incorporada («lavagem a frio»). As células são então enxaguadas, fixadas e secas. Para os tempos de incubação mais prolongados, pode não ser necessária a lavagem a frio. As lâminas são mergulhadas na emulsão autoradiográfica, expostas na obscuridade (ou seja, refrigeradas durante 7-14 dias), reveladas e coradas, após o que se procede à contagem dos grânulos de prata expostos. Devem ser preparadas duas ou três lâminas de cada animal.

▼B

1.5.8. **Análise**

As preparações devem conter um número suficiente de células com morfologia normal para permitir uma avaliação significativa da UDS. As preparações são examinadas microscopicamente para sinais de citotoxicidade evidente (por exemplo, picnose, níveis diminuídos de radiação proveniente da timina rotulada).

As lâminas devem ser codificadas antes da contagem dos grânulos. Normalmente são contadas 100 células de cada animal, de pelo menos duas lâminas; se forem contadas menos de 100 células/animal, deve ser fornecida uma justificação. As contagens dos grânulos dos núcleos em fase S não são tomadas em consideração, mas a proporção de células em fase S pode ser registada.

O grau de incorporação da ^{3}H-TdR nos núcleos e citoplasma das células morfologicamente normais, evidenciado pelo depósito de grânulos de prata, deve ser determinado por métodos apropriados.

As contagens de grânulos são determinadas nos núcleos (grânulos nucleares, NG) e em sectores do citoplasma equivalentes ao núcleo (grânulos citoplásmicos, CG). As contagens de CG são feitas no sector do citoplasma mais rotulado ou fazendo a média de dois ou três locais com grânulos citoplásmicos escolhidos aleatoriamente junto à região do núcleo. Outros métodos de contagem (por exemplo, contagem de células inteiras) podem ser utilizados, se se justificarem (6).

2. **DADOS**

2.1. TRATAMENTO DOS RESULTADOS

Devem ser apresentados dados relativos a cada lâmina e a cada animal. Para além disso, todos os dados devem ser apresentados sob a forma de um quadro. As contagens de granulação nuclear líquida (NNG) devem ser calculadas para cada célula, para cada animal, para cada dose e para cada tempo de colheita subtraindo as contagens CG das contagens NG. Se forem contadas as «células em reparação», os critérios para definir essas células devem ser justificados e baseados em dados históricos ou dos controlos negativos realizados em paralelo com o ensaio. Os resultados numéricos podem ser avaliados através de métodos estatísticos. Os métodos estatísticos a utilizar eventualmente devem ser escolhidos e justificados antes da realização do estudo.

2.2. AVALIAÇÃO E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Os exemplos de critérios para a definição de uma resposta como positiva/negativa incluem:

positiva
- i) Valores de NNG positivos, acima de um limiar pré-definido justificado com base nos dados históricos do laboratório; ou
- ii) Valores de NNG significativamente superiores aos do controlo em paralelo;

negativa
- i) Valores de NNG iguais/inferiores ao limiar de controlo histórico; ou
- ii) Valores de NNG não significativamente superiores aos do controlo em paralelo.

▼B

A importância biológica dos dados deve ser considerada, ou seja, devem ser tomados em consideração parâmetros como a variação de animal para animal, a relação dose/resposta e a citotoxicidade. Como auxílio para a avaliação dos resultados dos ensaios, poderão ser utilizados métodos estatísticos, embora a significância estatística não deva ser o único elemento para a determinação de uma resposta positiva.

Embora a maioria de experiências tenha resultados claramente positivos ou negativos, em casos raros o conjunto dos dados não permitirá que se obtenha uma opinião inequívoca sobre a actividade da substância em estudo, podendo acontecer que os resultados continuem a ser ambíguos ou duvidosos independentemente do número de vezes que a experiência seja repetida.

Um resultado positivo no ensaio UDS em células do fígado de mamíferos *in vivo* indica que a substância em estudo induz danos no ADN das células do fígado de mamíferos *in vivo* que podem ser reparados por síntese não programada de ADN *in vitro*. Um resultado negativo indica que, nas condições do ensaio, a substância em estudo não induz danos no ADN que sejam detectáveis pelo presente ensaio.

Deve ser discutida a probabilidade de a substância em estudo ou os seus metabolitos alcançarem o sistema circulatório geral ou especificamente o tecido objectivo (ou seja, a toxicidade sistémica).

3. **APRESENTAÇÃO DE RELATÓRIOS**

RELATÓRIO DE ENSAIO

O relatório de ensaio deve incluir a seguinte informação:

Solvente/veículo:

— justificação para a escolha do veículo,

— solubilidade e estabilidade da substância em estudo no solvente/ /veículo, se conhecida.

Animais de ensaio:

— espécie/linha celular utilizada,

— número, idade e sexo dos animais,

— origem, condições de acomodação, alimentação, etc.,

— peso de cada animal no início do ensaio, incluindo a gama de pesos, a respectiva média e o desvio-padrão para cada grupo.

Condições de ensaio:

— controlos positivos e negativos veículo/solvente,

— resultados do estudo para definição da gama de doses, quando tenha sido realizado,

— justificação para a selecção das doses,

— preparação da substância em estudo,

— modo de administração da substância em estudo,

— justificação da via de administração escolhida,

— métodos usados para verificar se o agente em estudo atingiu o sistema circulatório geral, caso tenham sido utilizados,

▼B

— conversão da concentração da substância em estudo na alimentação/abeberação (ppm) para a dose real (mg/kg peso corporal/ /dia), quando aplicável,

— qualidade dos alimentos e da água,

— descrição pormenorizada dos calendários de tratamento e amostragem,

— métodos de medição da toxicidade,

— método de preparação e cultura das células do fígado,

— técnica de autoradiografia utilizada,

— número de lâminas preparadas e número de células contabilizadas,

— critérios de avaliação,

— critérios definidos para que o estudo seja considerado positivo, negativo ou não conclusivo.

Resultados:

— valores médios das contagens de grânulos nucleares, grânulos citoplásmicos e da granulação nuclear líquida para cada lâmina, animal e grupo,

— relação dose-resposta, quando seja possível de determinar,

— análise estatística, quando tenha sido realizada,

— sinais de toxicidade,

— dados relativos aos controlos positivos e negativos (solvente/ /veículo) realizados em paralelo com o ensaio,

— dados históricos relativos aos controlos positivos e negativos (solvente/veículo) realizados em paralelo com o ensaio, com as respectivas gama, valor médio e desvio-padrão,

— número de células «em reparação», caso tenham sido contabilizadas,

— número de células em fase S, caso tenham sido contadas,

— viabilidade das células.

Discussão dos resultados.

Conclusões.

4. **REFERÊNCIAS**

(1) Ashby, J., Lefevre, P.A., Burlinson, B. and Penman, M.G., (1985) An Assessment of the *In Vivo* Rat Hepatocyte DNA Repair Assay. Mutation Res., 156, p. 1-18.

(2) Butterworth, B.E., Ashby, J., Bermudez, E., Casciano, D., Mirsalis, J., Probst, G. and Williams, G., (1987) A Protocol and Guide for the *In Vivo* Rat Hepatocyte DNA-Repair Assay. Mutation Res. 189, p. 123-133.

(3) Kennelly, J.C., Waters, R., Ashby, J., Lefevre, P.A., Burlinson, B., Benford, D.J., Dean, S.W. and Mitchell, I. de G., (1993) *In Vivo* Rat Liver UDS Assay. In: Kirkland D.J. and Fox M., (Eds) Supplementary Mutagenicity Tests: UKEM Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part II revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, p. 52-77.

▼B

(4) Madle, S., Dean, S.W., Andrae, U., Brambilla, G., Burlinson, B., Doolittle, D.J., Furihata, C., Hertner, T., McQueen, C.A. and Mori, H., (1993) Recommendations for the Performance of UDS Tests *In Vitro* and *In Vivo*. Mutation Res., 312, p. 263--285.

(5) Fautz, R., Hussain, B., Efstathiou, E. and Hechenberger-Freudl, C., (1993) Assessment of the Relation Between the Initial Viability and the Attachment of Freshly Isolated Rat Hepatocytes Used for the *In Vivo/In Vitro* DNA Repair Assay (UDS). Mutation Res., 291, p. 21-27.

(6) Mirsalis, J.C., Tyson, C.K. and Butterworth, B.E., (1982) Detection of Genotoxic Carcinogens in the *In Vivo/In Vitro* Hepatocyte DNA Repair Assay. Environ. Mutagen, 4, p. 553-562.

▼M8

B.40. CORROSÃO DA PELE *IN VITRO*: MÉTODO DE ENSAIO DA RESISTÊNCIA ELÉTRICA TRANSCUTÂNEA (RET)

INTRODUÇÃO

1. O presente método de ensaio é equivalente à *Test Guideline* (TG) 430 (2015) da OCDE. Entende-se por corrosão da pele a produção de danos irreversíveis nos tecidos cutâneos, que se manifestam como necrose visível em toda a epiderme e atingindo a derme, por aplicação de um produto químico em estudo [definido pelo Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos da ONU (GHS) (1) e pelo Regulamento (UE) n.º 1272/2008 da União Europeia relativo à classificação, rotulagem e embalagem de substâncias e misturas (CRE) ([1])]. O presente método de ensaio B.40 atualizado prevê um procedimento *in vitro* que permite a identificação de substâncias e misturas corrosivas e não corrosivas em conformidade com o sistema GHS da ONU (1) e com o CRE.

2. A determinação da corrosividade cutânea tem normalmente recorrido a animais de laboratório (método B.4, equivalente ao TG 404 da OCDE originalmente adotado em 1981 e revisto em 1992, 2002 e 2015) (2). Para além do presente método de ensaio B.40, foram validados e adotados outros métodos de ensaio *in vitro* para o ensaio do potencial de corrosão da pele dos produtos químicos, como o método de ensaio B.40bis (equivalente ao método TG 431 da OCDE) (3) e o método de ensaio B.65 (equivalente ao TG 435 da OCDE) (4), que também permitem identificar subcategorias de produtos químicos corrosivos, quando necessário. Foram adotados vários métodos de ensaio *in vitro* validados, como o método de ensaio B.46 [equivalente ao TG 439 da OCDE (5)], que devem ser utilizados para o ensaio de irritação cutânea. Um documento de orientação da OCDE sobre abordagens integradas de ensaio e avaliação (IATA) para a corrosão e irritação da pele descreve vários módulos que agrupam várias fontes de informação e instrumentos de análise e fornece orientações sobre (i) como integrar e utilizar os ensaios existentes e os dados não provenientes de ensaios para a avaliação dos potenciais de irritação e de corrosão cutâneas dos produtos químicos e (ii) propõe uma abordagem quando há necessidade de ensaios complementares (6).

3. O presente método de ensaio incide na corrosão cutânea no ser humano. É baseado no método de ensaio da resistência elétrica transcudana (RET) da pele da ratazana, que utiliza discos de pele para identificar substâncias corrosivas pela sua capacidade de produzir uma perda da integridade normal do *status corneum* e da função de barreira. A diretriz de ensaio correspondente da OCDE foi adotada em 2004 e atualizada em 2015 para ter em conta o documento de orientação IATA.

4. A fim de avaliar testes de corrosão da pele *in vitro* para fins normativos, foram realizados estudos de pré-validação (7), seguidos de um estudo de validação formal do método de ensaio RET para avaliar a corrosão cutânea na pele de ratazanas (8) (9) (10) (11). O resultado destes estudos levou à

([1]) Regulamento (CE) n.º 1272/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16 de dezembro de 2008, relativo à classificação, rotulagem e embalagem de substâncias e misturas, que altera e revoga as Diretivas 67/548/CEE e 1999/45/CE, e altera o Regulamento (CE) n.º 1907/2006, JO L 353 de 31.12.2008.

▼M8

recomendação de que o método de teste RET (designado método de referência validado – MRV) poderia ser utilizado para fins normativos para a avaliação da corrosividade de pele *in vivo* (12) (13) (14).

5. Antes de se poder utilizar um método de ensaio proposto de RET *in vitro* para a corrosão da pele diferente do MRV para efeitos normativos, é necessário determinar a sua fiabilidade e adequação (precisão), bem como as limitações para a utilização proposta, de modo a garantir a sua similaridade com o MRV, de acordo com os requisitos das normas de desempenho (15). A aceitação mútua de dados nos termos do acordo da OCDE só poderá ser garantida no caso de métodos de ensaio novos ou atualizados de acordo com as normas de desempenho, se esses métodos tiverem sido revistos e incluídos na correspondente diretriz de ensaio da OCDE.

DEFINIÇÕES

6. As definições utilizadas constam do apêndice.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

7. Um estudo de validação (10) e outros estudos publicados (16) (17) indicaram que o método de ensaio de RET em pele de ratazana permite distinguir substâncias reconhecidamente corrosivas da pele e não corrosivas, com uma sensibilidade global de 94 % (51/54) e uma especificidade de 71 % (48/68) para uma base de dados de 122 substâncias.

8. O presente método de ensaio incide na corrosão da pele *in vitro*. Permite a identificação de produtos químicos não corrosivos e corrosivos, em conformidade com o GHS da ONU/CRE. Uma limitação do método, comprovada pelos estudos de validação (8) (9) (10) (11), reside no facto de não permitir a subcategorização de substâncias e misturas corrosivas em conformidade com o GHS da ONU/CRE. O quadro regulamentar em causa determinará a forma como o método será aplicado. Embora não forneça informações adequadas sobre a irritação da pele, deve notar-se que o método B.46 incide especificamente no efeito de irritação cutânea da pele *in vitro* (5). Para uma avaliação completa dos efeitos locais na pele após uma exposição única por via dérmica, consultar o documento de orientações da OCDE sobre IATA (6).

9. Uma vasta gama de produtos químicos, constituída essencialmente por substâncias, foi testada na validação subjacente ao presente método de ensaio; a base de dados empíricos do estudo de validação foi de 60 substâncias que cobrem um vasto leque de classes químicas (8) (9). Com base nos dados globais disponíveis, o método de ensaio é aplicável a um vasto leque de classes químicas e de estados físicos, incluindo líquidos, semissólidos, sólidos e ceras. No entanto, dado que, para determinados estados físicos específicos, não se encontram imediatamente disponíveis elementos de ensaio com dados de referência adequados, é de notar que, durante a validação, foi avaliado um número comparativamente pequeno de ceras e de sólidos corrosivos. Os líquidos podem ser aquosos ou não, e os sólidos podem ser solúveis ou insolúveis na água. Nos casos em que seja possível demonstrar a inaplicabilidade do método de ensaio a uma determinada categoria de substâncias, o mesmo não deve ser utilizado para essa categoria específica de substâncias. Presume-se, além disso, que o método é aplicável às misturas como extensão da sua aplicabilidade a substâncias. No entanto, uma vez que as misturas abrangem uma vasta gama de categorias e composições e que os dados atualmente disponíveis sobre a análise de misturas são limitados, o método não deve ser utilizado para uma categoria específica de misturas nos casos em que puder ser demonstrada a sua inaplicabilidade a essa categoria específica (por exemplo, na sequência de uma estratégia como a proposta por Eskes *et al.*, 2012) (18). Antes da aplicação do método a uma mistura para obter dados com fins normativos, importa ponderar se – e, em caso afirmativo, por que motivo – pode proporcionar resultados adequados para o efeito.

▼M8

Essas considerações não são necessárias se existir um requisito normativo para o ensaio da mistura. Os estudos de validação ainda não incidiram em gases e aerossóis (8) (9). Embora se admita que uns e outros possam ser testados com recurso ao método de ensaio de RET, a versão atual do método não permite o ensaio de gases nem de aerossóis.

PRINCÍPIO DO ENSAIO

10. O produto químico em estudo é aplicado durante 24 horas, no máximo, sobre a superfície epidérmica de discos cutâneos num sistema de ensaio com dois compartimentos, no qual o disco estabelece a separação entre os compartimentos. Os discos cutâneos são retirados de ratazanas com 28 a 30 dias de idade, eutanasiadas. Os produtos químicos corrosivos são identificados pela sua capacidade de causarem uma perda da integridade normal do *stratum corneum* e da função de barreira, perda essa que é medida pela descida da RET abaixo de um determinado limiar (16) (ver ponto 32). Para determinação da RET na pele da ratazana, foi selecionado um valor-limite de 5 kΩ, com base numa multiplicidade de dados obtidos com uma vasta gama de substâncias, situando-se a grande maioria dos valores claramente muito acima (frequentemente > 10 kΩ) ou muito abaixo (frequentemente < 3 kΩ) desse valor (16). Em geral, os produtos químicos em estudo não são corrosivos para os animais, mas simplesmente irritantes (ou não irritantes), não reduzem a RET abaixo daquele valor-limite. A utilização de outras preparações cutâneas ou de outros equipamentos pode alterar o valor-limite, necessitando da correspondente validação.

11. O método inclui uma etapa de ligação de um corante, para a confirmação dos resultados positivos na determinação da RET (incluindo próximos de 5 kΩ). A etapa de ligação do corante esclarece se o aumento de permeabilidade iónica se deve à destruição física do *stratum corneum*. O método de determinação da RET em pele de ratazana revelou-se capaz de prever a corrosividade *in vivo* no coelho, determinada pelo TM B.4 (2).

DEMONSTRAÇÃO DE COMPETÊNCIA

12. Antes de utilizarem de forma rotineira o método de ensaio de RET em pele de ratazana conforme ao presente método de ensaio, os laboratórios devem demonstrar a sua competência técnica, classificando corretamente as doze substâncias de referência recomendadas no quadro 1. No caso de uma substância incluída na lista estar indisponível ou sempre que se justifique, pode ser utilizada outra substância para a qual estejam disponíveis dados adequados de referência *in vivo* e *in vitro* [por exemplo, da lista de produtos químicos de referência (16)], desde que sejam aplicados os critérios de seleção descritos no quadro 1.

Quadro 1

Lista de substâncias de referência [1]

Substância	N.º CAS	Classe química [2]	SISTEMA GHS DA ONU/CRE Cat. com base em resultados *em vivo* [3]	MRV Cat. com base em resultados *in vitro*	Estado físico	pH [4]
Corrosivos *in vivo*						
N,N'-Dimetil dipropilenotriamina	10563-29-8	Base orgânica	1A	6 × C	L	8,3
1,2-Diaminopropano	78-90-0	Base orgânica	1A	6 × C	L	8,3

▼**M8**

Substância	N.º CAS	Classe química (2)	SISTEMA GHS DA ONU/CRE Cat. com base em resultados *em vivo* (3)	MRV Cat. com base em resultados *in vitro*	Estado físico	pH (4)
Corrosivos *in vivo*						
Ácido sulfúrico (10 %)	7664-93-9	Ácido inorgânico	(1A/)1B/1C	5 × C 1 × × NC	L	1,2
Hidróxido de potássio (solução aquosa a 10 %)	1310-58-3	Base orgânica	(1A/)1B/1C	6 × C	L	13,2
Ácido octanoico (caprílico)	124-07-2	Ácido orgânico	1B/1C	4 × C 2 × NC	L	3,6
2-*terc*-butilfenol	88-18-6	Fenol	1B/1C	4 × C 2 × NC	L	3,9
Não corrosivos *in vivo*						
Ácido isoesteárico	2724-58-5	Ácido orgânico	NC	6 × NC	L	3,6
4-Amino-1,2,4-triazolo	584-13-4	Base orgânica	NC	6 × NC	S	5,5
Brometo de fenetilo	103-63-9	Eletrófilo	NC	6 × NC	L	3,6
4-(Metiltio)-benzaldeído	3446-89-7	Eletrófilo	NC	6 × NC	L	6,8
1,9-Decadieno	1647-16-1	Orgânico neutro	NC	6 × NC	L	3,9
Tetracloroetileno	127-18-4	Orgânico neutro	NC	6 × NC	L	4,5

Abreviaturas: aq = aquoso; N.º CAS = número de registo do Chemical Abstracts Service; MRV = método de referência validado; C = corrosivo; NC = não corrosivo.

(1) As substâncias de referência, divididas, em primeiro lugar, em substâncias corrosivas e não corrosivas e depois em subcategorias de corrosão e em classes químicas, foram selecionadas a partir das substâncias utilizadas no estudo de validação ECVAM do método de ensaio de RET em pele de ratazana (8) (9). Salvo indicação em contrário, as substâncias foram ensaiadas ao nível de pureza obtido quando adquiridas no comércio (8). A seleção incluiu, na medida do possível, substâncias que: (i) sejam representativas da gama de respostas de corrosividade (p. ex. não corrosivas; fraca a forte corrosão) que o VRM é capaz de medir ou prever; (ii) sejam representativas das classes de produtos químicos utilizados no estudo de validação; (iii) reflitam as características de desempenho do VRM; (iv) tenham estruturas químicas bem definidas; (v) induzam resultados definitivos no método de ensaio de referência *in vivo*; (vi) estejam comercialmente disponíveis; e (vii) não estejam associadas a custos de eliminação proibitivos.

(2) Classe química atribuída por Barratt *et al.* (8).

(3) Os grupos de embalagem ONU correspondentes são, respetivamente, os I, II e III para as categorias 1A, 1B e 1C do GHS da ONU/CRE.

(4) Os valores de pH foram obtidos a partir de Fentem *et al.* (9) e Barratt *et al.* (8).

▼M8

PROCEDIMENTO

13. Existem procedimentos operacionais normalizados (PON) para o método de ensaio de corrosão da pele de ratazana (19). Os protocolos de ensaio de RET em pele de ratazana abrangidos pelo presente método devem cumprir as condições que se seguem.

Animais

14. Devem utilizar-se ratazanas, uma vez que a sensibilidade da sua pele às substâncias deste método de ensaio foi previamente demonstrada (12) e é a única fonte de pele que foi formalmente validada (8) (9). A estirpe e a idade da ratazana (no momento da colheita da pele) assumem particular importância, devendo os folículos pilosos encontrar-se na fase de dormência, antes do crescimento da pilosidade adulta.

15. Com uma pequena tosquiadora, cortam-se cuidadosamente os pelos dorsais e dos flancos de ratazanas, fêmeas ou machos, jovens (estirpe Wistar ou comparável), com aproximadamente 22 dias de idade. Os animais são depois cuidadosamente lavados e esfregados, devendo a zona da pele que irá ser utilizada ser mergulhada numa solução antibiótica (contendo, por exemplo, estreptomicina, penicilina, cloranfenicol e anfotericina em concentrações suficientes para inibir o crescimento bacteriano). Os animais voltam a ser lavados com solução antibiótica no terceiro ou quarto dia após a primeira lavagem e são utilizados nos três dias seguintes à segunda lavagem, quando o *stratum corneum* tiver recuperado da tosquia.

Preparação dos discos cutâneos

16. Os animais são eutanasiados entre a idade de 28 e 30 dias (este fator é muito importante). Em seguida, retira-se a pele dorsal lateral e remove-se a gordura subcutânea em excesso, raspando cuidadosamente. Cortam-se discos cutâneos de aproximadamente 20 mm de diâmetro. A pele pode ser guardada antes da utilização dos discos, desde que se demonstre que os dados de controlo (positivos e negativos) são equivalentes aos obtidos com pele fresca.

17. Cada disco cutâneo é colocado numa das extremidades de um tubo de politetrafluoroetileno (PTFE), com a superfície epidérmica em contacto com o tubo. A pele é fixada na extremidade do tubo com uma junta tónica em borracha e elimina-se o tecido em excesso. A junta tórica é então envolvida em vaselina, de forma a garantir a estanquidade da sua união com o tubo de PTFE. Este é depois suspenso com uma tampa-suporte de molas dentro de uma câmara recetora com uma solução de $MgSO_4$ (154 mM) (figura 1). O disco cutâneo deve ficar totalmente imerso na solução de $MgSO_4$. Cada pele de ratazana pode fornecer de 10 a 15 discos cutâneos. As dimensões do tubo e da junta tónica são as apresentadas na figura 2.

18. Antes do início do ensaio, a RET de dois discos cutâneos é medida a título de procedimento de controlo de qualidade para cada pele. Ambos os discos devem apresentar valores de resistência elétrica superiores a 10 kΩ para o resto dos discos a utilizar no método de ensaio. Se o valor da resistência for inferior a 10 kΩ, os discos restantes da pele em causa serão rejeitados.

Aplicação do produto químico em estudo e das substâncias de controlo

19. Para garantir a adequabilidade do modelo experimental, devem utilizar-se em paralelo, em cada estudo (experiência), uma amostra de controlo positiva e uma amostra de controlo negativa. Em cada estudo (ensaio) devem utilizar-se discos de pele de um único animal. Como substâncias de controlo positivo e negativo sugerem-se o ácido clorídrico 10 M e a água destilada, respetivamente.

▼M8

20. Os produtos químicos em estudo líquidos são aplicados uniformemente (150 µl) na superfície epidérmica no interior do tubo. Se a matéria ensaiada for sólida, aplicar-se-á uniformemente no disco uma quantidade suficiente da mesma, de modo a cobrir toda a superfície epidérmica. Em seguida, deita-se água desionizada (150 µl) por cima do sólido e agita-se suavemente o tubo. Para garantir um contacto máximo com a pele, pode ser necessário aquecer as matérias sólidas a 30 °C, para fundir ou amolecer o produto químico em estudo, ou moê-las, para produzir um pó ou granulado.

21. São utilizados três discos de pele para cada ensaio e cada produto químico de controlo em cada série de ensaios. Os produtos químicos de ensaio são aplicados por 24 horas, a 20-23 °C. O produto químico é removido por lavagem com um jato de água da torneira até que seja atingida a temperatura ambiente e não haja mais material a remover.

Medições de RET

22. A impedância da pele é medida como RET por meio de uma ponte de Wheatstone de baixa tensão e corrente alternada (18). As especificações gerais da ponte de Wheatstone são as seguintes: tensão operacional de 1 V a 3 V, corrente alternada sinusoidal ou retangular de 50 Hz a 1 000 Hz e gama de medição de pelo menos 0,1 kΩ a –30 kΩ. A ponte utilizada no estudo de validação media valores de indutância, capacitância e resistência até 2 000 H, 2 000 µF e 2 MΩ, respetivamente, a frequências de 100 Hz ou 1 kHz, utilizando valores em série ou em paralelo. Para o ensaio RET de corrosividade, as medições são registadas em resistência, à frequência de 100 Hz, utilizando valores em série. Antes da medição da resistência elétrica, reduz-se a tensão superficial da pele adicionando um volume de etanol a 70 % suficiente para cobrir toda a epiderme. Após alguns segundos, remove-se o etanol do tubo e hidrata-se o tecido adicionando 3 ml de solução de sulfato de magnésio (154 mM). Para medir a resistência do disco cutâneo em kΩ, colocam-se os elétrodos da ponte de Wheatstone de cada um dos lados do disco (figura 1). As dimensões dos elétrodos e o comprimento de cada elétrodo abaixo da pinça crocodilo são indicados na figura 2. A pinça aplicada ao elétrodo interno deve ficar apoiada no rebordo do tubo de PTFE durante a medição da resistência, de forma a garantir que o comprimento de elétrodo mergulhado na solução de sulfato de magnésio seja constante. O elétrodo externo deve ser colocado dentro da câmara recetora de forma a tocar no fundo da mesma. A distância entre a tampa-suporte de molas (*spring clip*) e o fundo do tubo de PTFE deve ser mantida constante (figura 2), porque afeta o valor de resistência medido. A distância entre o elétrodo interno e o disco cutâneo deve ser mínima (1 mm a 2 mm) e constante.

23. Se o valor de resistência medido exceder 20 kΩ, tal pode dever-se à presença de restos do produto químico em estudo na superfície epidérmica do disco cutâneo. Para eliminar essas matérias, poderá, por exemplo, tapar-se o tubo de PTFE com o polegar, usando luvas de borracha, e agitar-se durante cerca de 10 segundos. Rejeita-se a solução de sulfato de magnésio e repete-se a medição da resistência com solução fresca de $MgSO_4$.

24. As propriedades e dimensões da montagem de ensaio e o procedimento experimental aplicado podem influenciar os valores de RET obtidos. O limite de corrosão de 5 kΩ foi estabelecido a partir de dados obtidos com a montagem e segundo os procedimentos especificamente descritos no presente método. Se as condições de ensaio forem alteradas ou for utilizada uma montagem diferente, poderão ser aplicáveis outros valores-limite e de controlo. É, portanto, necessário calibrar a metodologia e os valores-limite de resistência ensaiando uma série de substâncias de referência selecionadas a partir das substâncias utilizadas no estudo de validação (8) (9), ou de classes químicas similares às das substâncias em estudo. O quadro 1 apresenta uma série de substâncias de referência adequadas.

▼M8

Métodos da ligação de corante

25. A exposição a determinadas matérias não corrosivas pode originar uma redução da resistência para valores inferiores ao limite de 5 kΩ, ao permitir a passagem de iões através do *stratum corneum*, que se traduz numa redução da resistência elétrica (9). Determinados compostos orgânicos neutros e substâncias, por exemplo, tensioativas (detergentes, emulsionantes e outras substâncias), podem remover os lípidos cutâneos, daí resultando uma maior permeabilidade iónica da barreira. Assim, se os valores de RET produzidos por esses produtos químicos forem inferiores ou iguais a cerca de 5 kΩ, na ausência de lesões visualmente percetíveis dos discos cutâneos, deve proceder-se a uma avaliação da penetração de corantes nos tecidos de controlo e nos tecidos tratados, a fim de determinar se os valores de RET obtidos se deveram a uma maior permeabilidade cutânea ou à corrosão da pele (7) (9). Neste último caso, se o *stratum corneum* estiver danificado, o corante sulforrodamina B, uma vez aplicado na superfície da pele, penetrará rapidamente e colorará o tecido subjacente. Este corante específico é estável perante uma grande variedade de substâncias, e não é afetado pelo processo de extração acima referido.

Aplicação e eliminação do corante sulforrodamina B

26. Depois da determinação da RET, a solução de sulfato de magnésio é removida do tubo e verifica-se cuidadosamente se a pele apresenta danos evidentes. Se não houver danos graves óbvios (por exemplo, perfuração), são aplicados à superfície epidérmica de cada disco de pele, durante 2 horas, 150 µl de uma solução a 10 % (m/v) em água destilada do corante sulforrodamina B (Acid Red 52; C.I. 45100; número CAS 3520-42-1). Lavam-se de seguida os discos em água corrente, à temperatura ambiente, durante cerca de 10 segundos, a fim de remover o corante em excesso ou não fixado. Os discos de pele devem então ser cuidadosamente retirados do tubo de PTFE e colocados num recipiente (por exemplo: um frasco de 20 ml) com água desmineralizada (8 ml). Agitam-se cuidadosamente os frascos durante 5 minutos, para remover os restos de corante que eventualmente não se tenham fixado. Repete-se este procedimento de lavagem e transferem-se os discos cutâneos para frascos que contenham 5 ml de uma solução a 30 % (m/v) de dodecilsulfato de sódio (SDS) em água destilada, incubando-se a 60 °C de um dia para o outro.

27. Depois da incubação, os discos cutâneos são retirados e rejeitados e a solução remanescente em cada frasco é centrifugada durante 8 minutos a 21 °C (força relativa de centrifugação: ~175 × *g*). Dilui-se então a 1:5 (v/v, ou seja, 1 ml + 4 ml) uma amostra de 1 ml do líquido sobrenadante com uma solução a 30 % (m/v) de SDS em água destilada. Mede-se a densidade ótica da solução resultante, a 565 nm.

Cálculo da concentração de corante

28. A concentração do corante sulforrodamina B por disco é calculada a partir dos valores de densidade ótica (9) (coeficiente de extinção molar do corante sulforrodamina B a 565 nm = 8,7 × 104; massa molecular = 580). Utilizando uma curva de calibração apropriada, determina-se a concentração de corante correspondente a cada disco cutâneo, calculando-se em seguida uma concentração média de corante para os replicados.

Critérios de aceitabilidade

29. Os valores médios de RET obtidos serão aceites se os valores das amostras de controlo positiva e negativa correspondentes se encontrarem dentro dos intervalos aceitáveis para o método no laboratório de ensaio. Os intervalos de resistência aceitáveis para o método e a montagem acima descritos são indicados no quadro seguinte:

▼**M8**

Controlo	Substância	Intervalo de resistência (kΩ)
Positivo	Ácido clorídrico 10 M	0,5 – 1,0
Negativo	Água destilada	10 – 25

30. Os valores médios obtidos para a ligação do corante serão aceites se os valores das amostras de controlo correspondentes se encontrarem dentro dos intervalos aceitáveis para o método. Os intervalos aceitáveis de concentração de corante que se sugerem para as substâncias de controlo, para o método e a montagem acima descritos, são indicados no quadro seguinte:

Controlo	Substância	Intervalo de concentração de corante (μg/disco)
Positivo	Ácido clorídrico 10 M	40 – 100
Negativo	Água destilada	15 – 35

Interpretação dos resultados

31. O valor-limite de TER que permite distinguir os produtos químicos corrosivos dos não corrosivos foi estabelecido durante a fase de otimização do método, testado numa fase de pré-validação e confirmado num estudo de validação formal.

32. O modelo de previsão do método de ensaio de corrosão cutânea em ratazanas (9) (19), associado ao sistema de classificação GHS da ONU/CRE, é apresentado a seguir:

O produto químico em estudo é considerado não corrosivo para a pele se:

i) o valor médio de RET obtido para a substância em estudo exceder 5 kΩ, ou

ii) o valor médio de RET obtido para o produto químico em estudo for inferior ou igual a 5 kΩ e

— os discos de pele não apresentarem danos evidentes (por exemplo, perfuração) e

— o teor médio de corante dos discos for inferior ao teor médio de corante de 10M de HCl para o controlo positivo obtido simultaneamente (ver ponto 30 para valores de controlo positivo).

Considera-se que o produto químico em estudo é corrosivo para a pele se:

i) o valor médio de RET obtido para o produto químico em estudo for inferior ou igual a 5 kΩ e os discos de pele estiverem claramente danificados (por exemplo, perfurados), ou

ii) o valor médio de RET obtido para o produto químico em estudo for inferior ou igual a 5 kΩ e

— os discos de pele não apresentarem danos evidentes (por exemplo, perfuração), mas

▼M8

— a concentração média de corante do disco for superior ou igual à concentração média de corante de 10M de HCl para o controlo positivo obtido simultaneamente (ver ponto 30 para valores de controlo positivo).

33. Se a classificação do produto químico em estudo for inequívoca, basta normalmente uma série de ensaios (experiência) constituída por, pelo menos, três discos replicados de pele. Contudo, em caso de resultados inconclusivos (por exemplo, medições discordantes dos replicados e/ou RET médio igual a 5 ±0,5 kΩ, deve ser considerada uma segunda série de testes independentes (experiência), bem como uma terceira em caso de resultados discordantes entre os dois primeiros ensaios (experiências).

DADOS E RELATÓRIOS

Dados

34. Os valores da resistência (kΩ) e os valores do teor de corante (μg/disco), se for caso disso, para o produto químico em estudo, bem como para os controlos positivos e negativos devem ser apresentados sob a forma de uma tabela, incluindo os dados para cada disco individual replicado (experiência) e os valores médios ±do DP. Todas as repetições de experiências devem ser comunicadas. Devem comunicar-se os danos observados nos discos cutâneos relativamente a cada produto químico em estudo.

Relatório de ensaio

35. O relatório de ensaio deve conter as seguintes informações:

Produto químico em estudo e substâncias de controlo

— Substância monocomponente: dados de identificação química, como as denominações IUPAC ou CAS, número CAS, código SMILES ou InChI, fórmula estrutural, pureza, identidade química das impurezas, caso se justifique e seja exequível, etc.;

— Substância multicomponentes, UVCB e mistura: caracterizada, na medida do possível, pela identidade química (ver acima), ocorrência quantitativa e pelas propriedades físico-químicas dos componentes;

— Aspeto físico, solubilidade em água e outras propriedades físico-químicas pertinentes;

— Proveniência e número do lote, se disponíveis;

— Tratamento do produto químico em estudo/substância de controlo antes do ensaio, se for o caso;

— Estabilidade do produto químico em estudo, data-limite de utilização ou data de reanálise, se conhecidas;

— Condições de armazenagem.

Animais de ensaio

— Estipe e sexo;

— Idade dos animais no momento em que foram dadores;

— Proveniência, condições de alojamento, alimentação, etc.;

— Pormenores sobre a preparação da pele.

▼**M8**

Condições de realização do ensaio

— Curvas de calibração da montagem de ensaio;

— Curvas de calibração para o ensaio de desempenho de ligação do corante, filtro de banda passante utilizado para a medição da densidade ótica (DO) e linearidade do dispositivo de medição da DO (espetrofotómetro), se for caso disso;

— Pormenores sobre o método de ensaio utilizado na medição das RET;

— Pormenores sobre o método de ensaio utilizado na medição da ligação do corante, se tiver sido o caso;

— Doses de ensaio utilizadas, duração do(s) período(s) de exposição e temperatura(s) de exposição;

— Informações pormenorizadas sobre o procedimento de lavagem utilizado após o período de exposição;

— Número de replicados cutâneos utilizados para cada produto químico em estudo (controlos positivos e negativos);

— Descrição de eventuais modificações na execução do ensaio;

— Referência a dados anteriormente publicados sobre o modelo; tal deve incluir, nomeadamente, o seguinte:

  i) Aceitabilidade dos valores do controlo positivo e negativo de RET (em kΩ), por referência aos intervalos de resistência do controlo positivo e negativo,

  ii) Aceitabilidade dos valores do controlo positivo e negativo do teor de corante (em μg/disco) por referência a concentrações de corante de controlo positivo e negativo,

  iii) Aceitabilidade dos resultados do ensaio por referência à variabilidade histórica entre os replicados do disco cutâneo,

— Descrição do modelo de critérios de decisão/previsão aplicado.

Resultados

— Quadro dos dados correspondentes aos ensaios específicos de determinação da RET e de ligação dos corantes (se for caso disso) para cada produto químico em estudo e controlos, para cada série de ensaios (experiências) e cada replicado de disco cutâneo (animais individuais e amostras individuais de pele), médias, DS e CV;

— Descrição dos efeitos eventualmente observados;

— Classificação atribuída, mencionando o modelo de previsão ou os critérios de decisão utilizados.

Discussão dos resultados

Conclusões

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(1) Nações Unidas (ONU) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second Revised Edition, UN New York and Geneva, 2013. Disponível em: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html].

▼**M8**

(2) Capítulo B.4 deste anexo, «Toxicidade aguda: irritação/corrosão dérmica»

(3) Capítulo B.40-A deste anexo, «Corrosão da pele *in vitro*:»

(4) Capítulo B.65 deste anexo: «Método de ensaio da membrana de estanquidade *in vitro*»

(5) Capítulo B.46 deste anexo, «Irritação cutânea in vitro: método de ensaio em epiderme humana reconstruída»

(6) OCDE (2014). Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(7) Botham P.A., Chamberlain M., Barratt M.D., Curren R.D., Esdaile D.J., Gardner J.R., Gordon V.C., Hildebrand B., Lewis R.W., Liebsch M., Logemann P., Osborne R., Ponec M., Regnier J.F., Steiling W., Walker A.P., and Balls M. (1995). A Prevalidation Study on *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 6.*ATLA* 23, 219-255.

(8) Barratt M.D., Brantom P.G., Fentem J.H., Gerner I., Walker A.P., and Worth A.P. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 1. Selection and Distribution of the Test Chemicals. *Toxic.In Vitro* 12, 471-482.

(9) Fentem J.H., Archer G.E.B., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdaile D.J., Holzhütter H.-G., and Liebsch M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests For Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. *Toxic.In Vitro*12, 483- 524.

(10) Balls M., Blaauboer B.J., Fentem J.H., Bruner L., Combes R.D., Ekwall B., Fielder R.J., Guillouzo A., Lewis R.W., Lovell D.P., Reinhardt C.A., Repetto G., Sladowski D., Spielmann H., and Zucco F. (1995). Practical Aspects of the Validation of Toxicity Test Procedures. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops.*ATLA*23, 129--147.

(11) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication No 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.

(12) EC-ECVAM (1998). Statement on the Scientific Validity of the Rat Skin Transcutaneos Electrical Resistance (TER) Test (an *In Vitro* Test for Skin Corrosivity), Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC10), 3 April 1998.

(13) ECVAM (1998). ECVAM News & Views. ATLA 26, 275-280.

(14) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (2002). ICCVAM Evaluation of EpiDerm™ (EPI--200), EPISKIN™ (SM), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Assay: *In Vitro* Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. NIH Publication No 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.

(15) OCDE (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test Method for Skin Corrosion in Relation to TG 430. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No 218. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

▼M8

(16) Oliver G.J.A., Pemberton M.A., and Rhodes C. (1986). An *In Vitro* Skin Corrosivity Test -Modifications and Validation. Fd. Chem. *Toxicol.* 24, 507-512.

(17) Botham P.A., Hall T.J., Dennett R., McCall J.C., Basketter D.A., Whittle E., Cheeseman M., Esdaile D.J., and Gardner J. (1992). The Skin Corrosivity Test *In Vitro:* Results of an Interlaboratory Trial. *Toxicol. In Vitro* 6,191-194.

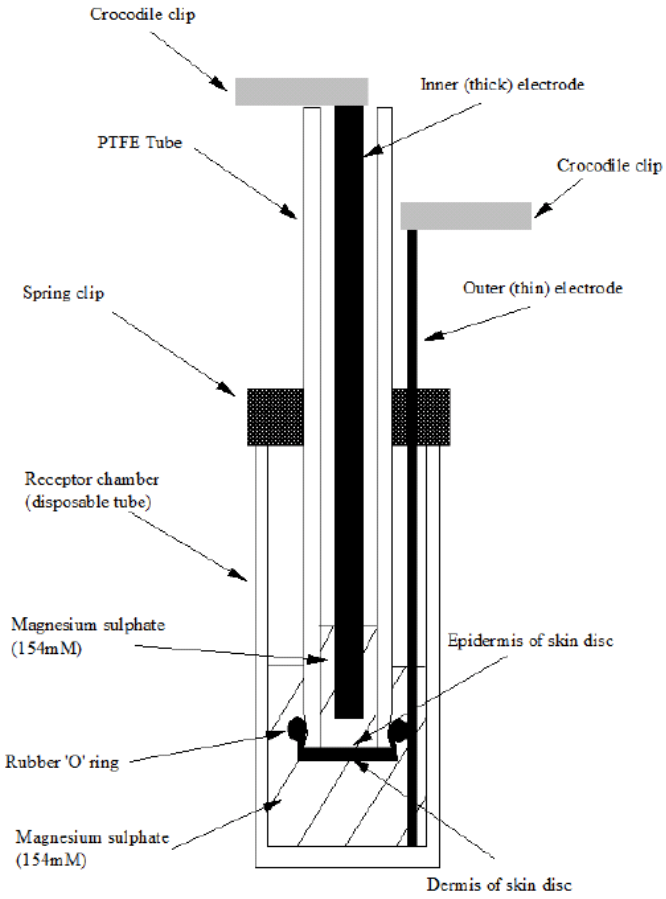
(18) Eskes C., Detappe V., Koëter H., Kreysa J., Liebsch M., Zuang V., Amcoff P., Barroso J., Cotovio J., Guest R., Hermann M., Hoffmann S., Masson P., Alépée N., Arce L.A., Brüschweiler B., Catone T., Cihak R., Clouzeau J., D'Abrosca F., Delveaux C., Derouette J.P., Engelking O., Facchini D., Fröhlicher M., Hofmann M., Hopf N., Molinari J., Oberli A., Ott M., Peter R., Sá-Rocha V.M., Schenk D., Tomicic C., Vanparys P., Verdon B., Wallenhorst T., Winkler G.C. and Depallens O. (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data Within the European Framework: Workshop Recommendations. Regul.*Toxicol.Pharmacol.* 62, 393-403.

(19) TER SOP (December 2008). *INVITTOX* Protocol (No 115) Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test.

(20) OCDE (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

Figura 1

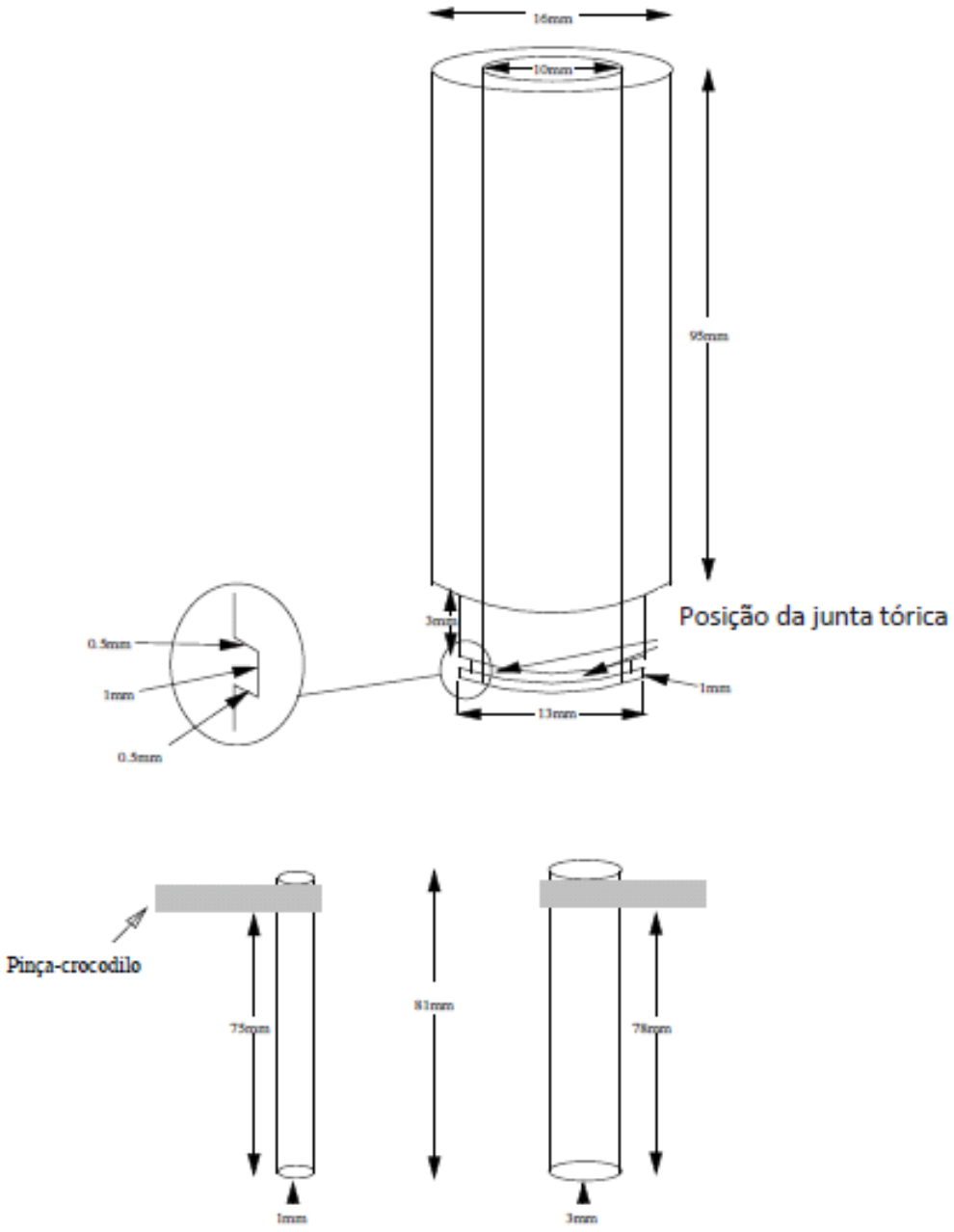
Montagem Para o Ensaio da ret em Pele de Ratazana



▼**M8**

Figura 2

Dimensões do tubo de Politetrafluoroetileno (PTFE) e do Tubo Recetor, bem como dos Elétrodos Utilizados



Fatores críticos da montagem ilustrada:

— Diâmetro interno do tubo de PTFE;

— Comprimento dos elétrodos em relação ao tubo de PTFE e ao tubo recetor, para que os elétrodos não toquem no disco cutâneo e de modo que um comprimento fixo de elétrodo esteja em contacto com a solução de $MgSO_4$;

▼**M8**

— A quantidade de solução de $MgSO_4$ no tubo recetor deve produzir, em relação ao nível no tubo de PTFE, um nível de líquido conforme o ilustrado na figura 1;

— O disco cutâneo deve ser convenientemente fixado ao tubo de PTFE, para que a resistência elétrica seja uma medida fiável das propriedades da pele.

▼**M8**

Apêndice

DEFINIÇÕES

Adequação: Relação do método de ensaio com o efeito em causa; pertinência e utilidade do ensaio para o fim em vista. Traduz a medida em que o método de ensaio mede ou prevê corretamente o efeito biológico em causa. A adequação compreende a exatidão (concordância) do método de ensaio (20).

C: Corrosivo

Concordância: Uma medida do desempenho do método de ensaio no caso dos métodos cujos resultados sejam estabelecidos em função de categorias e constitui um dos aspetos da adequação. Este termo e o termo «exatidão» são muitas vezes utilizados indistintamente para indicar a proporção de produtos químicos testados que são corretamente classificados como positivos ou negativos. A concordância é altamente dependente da prevalência do produto químico em estudo positivos no tipo de produto químico em estudo (20).

Corrosão da pele *in vivo*: Produção de danos irreversíveis à pele, nomeadamente a necrose visível da epiderme, prolongando-se para a derme, após a aplicação de um produto químico em estudo durante um máximo de quatro horas. São exemplos típicos de reações corrosivas as úlceras, hemorragias e escaras sanguinolentas e, para o final do período de observação de 14 dias, a descoloração, devido à perda de pigmentação da pele, a formação de zonas de alopécia total e a ocorrência de cicatrizes. As lesões duvidosas poderão ser esclarecidas por métodos histopatológicos.

CP: Amostra de controlo positiva, um replicado que contém todos os componentes do sistema de ensaio e foi tratado com uma substância que comprovadamente induz reação positiva. Para que possa determinar-se a variabilidade no tempo da reação a esta amostra de controlo, essa reação não deve ser excessivamente positiva.

DO: Densidade ótica.

Especificidade: Proporção dos produtos químicos negativos/inativos que são corretamente classificados pelo método de ensaio. Constitui uma medida da exatidão de um método de ensaio cujos resultados sejam estabelecidos em função de categorias e é um aspeto importante a ter em conta na avaliação da adequação do método de ensaio (20).

Exatidão: Grau de acordo entre os resultados do método de ensaio e os valores de referência aceites. Constitui uma medida do desempenho do método e um dos aspetos da adequação. Este termo e o termo «concordância» são muitas vezes utilizados indistintamente para indicar a proporção de resultados corretos de um método de ensaio (20).

Fiabilidade: Medida em que, utilizando o mesmo protocolo, um método de ensaio pode ser continuadamente reproduzido no mesmo laboratório e em laboratórios diferentes. A fiabilidade é avaliada com base nos valores calculados das reprodutibilidades intralaboratorial e interlaboratorial (20).

GHS (Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (ONU)): Sistema que propõe a classificação dos produtos químicos (substâncias e misturas) em função de tipos e níveis normalizados de perigos físicos, sanitários e ambientais e trata ainda dos correspondentes elementos de comunicação, como pictogramas, palavras-sinal, advertências de perigo, recomendações de prudência e fichas de dados de segurança, de modo a transmitir informações sobre os efeitos indesejáveis do produto em causa, com vista à proteção das pessoas (empregadores, trabalhadores, transportadores, consumidores, pessoal dos serviços de emergência, etc.) e do ambiente (1).

IATA: Abordagem integrada de ensaio e avaliação.

Mistura: Uma mistura ou solução composta por duas ou mais substâncias.

▼M8

Substância monocomponente: Substância, definida pela sua composição quantitativa, da qual um dos principais componentes está presente num teor de, pelo menos, 80 % (m/m).

Substância multicomponentes: Substância, definida pela sua composição quantitativa, da qual mais de um dos principais componentes está presente numa concentração ≥ 10 % (m/m) e < 80 % (m/m). As substâncias multicomponentes resultam de processos de fabrico. A diferença entre uma mistura e uma substância multicomponentes reside em que a primeira se obtém misturando duas ou mais substâncias, sem reação química. As substâncias multicomponentes resultam de reações químicas.

NC: Não corrosivo.

Normas de desempenho: Normas associadas a um método de ensaio validado com base nas quais pode ser avaliada a comparabilidade de um método de ensaio proposto que lhe seja funcional e mecanisticamente similar. Incluem: (i) componentes essenciais do método de ensaio; (ii) uma lista mínima de produtos químicos de referência, escolhidos de entre os produtos químicos utilizados para demonstrar o desempenho aceitável do método de ensaio validado; e (iii) níveis de fiabilidade e exatidão semelhantes, baseados no que foi obtido para o método de ensaio validado, que o método de ensaio proposto deve demonstrar quando avaliado pela utilização da lista mínima de produtos químicos de referência.

Produto químico: Uma substância ou mistura.

Produto químico em estudo: Qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado o presente método de ensaio.

Resistência elétrica transcutânea (RET): Valor da resistência em kΩ medido para a impedância elétrica da pele. Trata-se de um método simples e robusto de avaliação da função de barreira por meio do registo do fluxo iónico através da pele com uma ponte de Wheatstone.

Sensibilidade: Proporção dos produtos químicos positivos/ativos que são corretamente classificados pelo método de ensaio. Constitui uma medida da exatidão de um método de ensaio cujos resultados sejam estabelecidos em função de categorias e é um aspeto importante a ter em conta na avaliação da adequação do método de ensaio (20).

Série (de ensaio): Um único produto químico em estudo testado simultaneamente num mínimo de três discos de pele.

Substância: um elemento químico e os seus compostos no estado natural ou obtido por qualquer processo de produção, incluindo qualquer aditivo necessário para preservar a sua estabilidade e qualquer impureza derivada do processo utilizado, mas excluindo qualquer solvente que possa ser separado sem afetar a estabilidade da substância nem modificar a sua composição.

UVCB: Substâncias de composição desconhecida ou variável, produtos de reação complexos ou materiais biológicos.

▼M8

B.40.A. CORROSÃO DA PELE *IN VITRO*: MÉTODO DE ENSAIO COM EPIDERME HUMANA RECONSTRUÍDA (RHE)

INTRODUÇÃO

1. O presente método de ensaio é equivalente à *Test Guideline* (TG) 431 (2016) da OCDE. Entende-se por corrosão da pele a produção de danos irreversíveis nos tecidos cutâneos, que se manifestam como necrose visível em toda a epiderme e atingindo a derme, por aplicação de um produto químico em estudo [definido pelo Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos da ONU (GHS) (1) e pelo Regulamento (UE) n.º 1272/2008 da União Europeia relativo à classificação, rotulagem e embalagem de substâncias e misturas (CRE) ([1])]. O presente método de ensaio B.40bis atualizado prevê um procedimento *in vitro* que permite a identificação de substâncias e misturas corrosivas e não corrosivas em conformidade com o sistema GHS da ONU e com o CRE. Permite igualmente uma subcategorização parcial de substâncias corrosivas.

2. A determinação do potencial de corrosão cutânea de produtos químicos tem normalmente recorrido a animais de laboratório (método B.4 ao TG 404 da OCDE originalmente adotado em 1981 e revisto em 1992, 2002 e 2015) (2). Para além do presente método de ensaio B.40bis, foram validados e adotados dois outros métodos para o ensaio *in vitro* do potencial de corrosão da pele dos produtos químicos, como o método B.40 (equivalente ao método TG 430 da OCDE) (3) e o método B.65 (equivalente ao método TG 435 da OCDE) (4). Além disso, foi adotado o método B.46 (equivalente à *Test Guideline* TG 439 da OCDE) (5) para o ensaio *in vitro* do potencial de irritação cutânea. Um documento de orientação da OCDE sobre abordagens integradas de ensaio e avaliação (IATA) para a corrosão e corrosão da pele descreve vários módulos que agrupam as fontes de informação e os instrumentos de análise e fornece orientações sobre: i) como integrar e utilizar os ensaios existentes e os dados não obtidos no ensaio de avaliação de potenciais de produtos químicos em termos de irritação cutânea e de corrosão cutânea e ii) propor uma abordagem na necessidade de ensaios complementares (6).

3. O presente método de ensaio incide na corrosão cutânea no ser humano. Utiliza a epiderme humana reconstruída (obtida a partir de queratinócitos de epiderme humana não transformados) que reproduz com rigor as propriedades histológicas, morfológicas, bioquímicas e fisiológicas das partes superiores da pele humana, isto é, da epiderme. A diretriz de ensaio da OCDE foi adotada inicialmente em 2004 e atualizada em 2013, a fim de incluir métodos de ensaio adicionais utilizando modelos de epiderme humana reconstruída e a possibilidade de utilizar os métodos de apoio à subcategorização de produtos químicos corrosivos e de novo atualizada em 2015 para ter em conta o documento de orientação da IATA e para introduzir a utilização de um procedimento alternativo para a medição da viabilidade.

4. O presente método inclui quatro modelos validados comercialmente disponíveis de epiderme humana reconstruída. Foram realizados estudos de pré-validação (7), seguidos de um estudo de validação formal para avaliar a corrosão da pele (8) (9) (10) (12) relativamente a dois desses modelos de ensaio comercialmente disponíveis, o método Modelo Normalizado de EpiSkin™ e o método Ensaio de corrosividade cutânea EpiDerm™ (EPI-200), referidos no texto como métodos de referência validados – MRV. O resultado destes estudos levou à recomendação de que os dois MRV supramencionados podem ser utilizados para fins normativos para distinguir as

([1]) Regulamento (CE) n.º 1272/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16 de dezembro de 2008, relativo à classificação, rotulagem e embalagem de substâncias e misturas, que altera e revoga as Diretivas 67/548/CEE e 1999/45/CE, e altera o Regulamento (CE) n.º 1907/2006, JO L 353 de 31.12.2008.

▼M8

substâncias corrosivas (C) das substâncias não corrosivas (NC) e de que o método EpiSkin™ pode, além disso, ser utilizado para apoiar a subcategorização das substâncias corrosivas (13) (14) (15). Dois outros modelos de ensaio de corrosão cutânea *in vitro* em epiderme humana reconstruída disponíveis comercialmente em corrosão cutânea *in vitro* têm mostrado resultados similares ao do MRVEpiDerm™ de acordo com a validação baseada em PS (16)(17)(18). Trata-se de SkinEthic™ RHE ([1]) and epiCS® (anteriormente designado EST-1000), que também podem ser utilizados para fins normativos, para distinguir substâncias corrosivas e não corrosivas (19) (20). Estudos de pós-validação realizados pelos produtores do modelo de epiderme humana reconstruída nos anos de 2012 a 2014 com um protocolo aperfeiçoado que corrige interferências de redução MTT inespecífica pelo produto químico em estudo permitiram melhorar o desempenho da discriminação de C/NC, bem como da subcategorização de corrosivos (21) (22). Foram realizadas outras análises estatísticas dos dados pós-validação gerados com EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE and EpiCS® para identificar modelos previsionais alternativos que tenham melhorado a capacidade de prever a subcategorização (23).

5. Antes de se poder utilizar um método de ensaio proposto de RhE *in vitro* para a corrosão da pele similar ou alterado diferente dos MRV para efeitos normativos, é necessário determinar a sua fiabilidade e adequação (exatidão), bem como as limitações para a utilização proposta, de modo a garantir a sua similaridade com os MRV, de acordo com os requisitos das normas de desempenho (15) estabelecidas em conformidade com os princípios do documento de orientação n.º 34 da OCDE (25). A aceitação mútua de dados nos termos do acordo da OCDE só poderá ser garantida no caso de métodos de ensaio novos ou atualizados de acordo com as normas de desempenho, se estes métodos tiverem sido revistos e incluídos na correspondente diretriz de ensaio da OCDE. Os modelos de ensaio incluídos nessa diretriz de ensaio podem ser utilizados para satisfazer as exigências dos países em matéria de resultados dos ensaios sobre o método de ensaio *in vitro* da corrosão cutânea, beneficiando simultaneamente da aceitação mútua de dados.

DEFINIÇÕES

6. As definições utilizadas constam do apêndice 1.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

7. O presente método de ensaio permite a identificação de substâncias e misturas corrosivas e não corrosivas em conformidade com o GHS da ONU e com o CRE. Corrobora a subcategorização de substâncias e misturas corrosivas na subcategoria facultativa 1A, em conformidade com o sistema GHS da ONU (1), bem como numa combinação das subcategorias 1B e 1C (21) (22) (23). Uma limitação deste método é que não permite discriminar entre a subcategoria 1B e a subcategoria 1C, de acordo com o GHS da ONU e com o CRE, devido ao conjunto limitado de produtos químicos corrosivos *in vivo* conhecidos da subcategoria 1C. Os modelos de ensaio EpiSkin™, EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE and epiCS® permitem classificar em subcategorias (ou seja, 1A *versus* 1B e 1C *versus* NC)

8. Uma vasta gama de produtos químicos – principalmente substâncias individuais – foi testada, na validação, para apoio dos modelos de ensaio incluídos neste método, utilizados para a identificação de substâncias corrosivas e não corrosivas; a base de dados empíricos do estudo de validação foi constituída

([1]) A abreviatura RhE (epiderme humana reconstruída) é utilizada para todos os modelos baseados na tecnologia de RhE. A abreviatura RHE utilizada em conjunção com o modelo SkinEthic™ significa o mesmo, mas, como parte do nome do método de teste específicos comercializado, é escrito em maiúsculas.

▼M8

por 60 produtos químicos que cobrem um vasto leque de classes químicas (8) (9) (10). Os ensaios para demonstrar a sensibilidade, a especificidade, a exatidão e a reprodutibilidade intralaboratorial do ensaio para a subcategorização foram realizados pelos concetores do método; os resultados foram revistos pela OCDE (21) (22) (23). Com base nos dados globais disponíveis, o método de ensaio é aplicável a um vasto leque de classes químicas e de estados físicos, incluindo líquidos, semissólidos, sólidos e ceras. Os líquidos podem ser aquosos ou não, e os sólidos podem ser solúveis ou insolúveis na água. Sempre que possível, os sólidos devem ser moídos em pó fino antes da aplicação; nenhum outro tratamento prévio da amostra é necessário. Nos casos em que se possa demonstrar a inaplicabilidade de modelos de ensaio incluídos neste método a uma categoria específica de produtos químicos em estudo, estes não devem ser utilizados para essa categoria específica de produtos químicos. Presume-se, além disso, que o método de ensaio é aplicável às misturas como extensão da sua aplicabilidade a substâncias. No entanto, uma vez que as misturas abrangem uma vasta gama de categorias e composições e que só se dispõe atualmente de informações limitadas sobre a análise de misturas, nos casos em que se possa demonstrar a inaplicabilidade do método de ensaio a uma categoria específica de misturas – por exemplo, na sequência de uma estratégia como a proposta no ponto (26) –, o método de ensaio não deve ser utilizado para essa categoria específica de misturas. Antes da aplicação do método a uma mistura para obter dados com fins normativos, importa ponderar se – e, em caso afirmativo, por que motivo – o mesmo pode proporcionar resultados adequados para o efeito. Essas considerações não são necessárias se existir um requisito normativo para o ensaio da mistura. Os gases e aerossóis ainda não foram avaliados em estudos de validação (8) (9) (10). Embora se possa considerar que podem ser ensaiados utilizando a tecnologia da epiderme humana reconstruída, o método de ensaio atual não permite o ensaio de gases e aerossóis.

9. Os produtos químicos que absorvem luz na mesma gama que o MTT formazano e os produtos químicos em estudo capazes de reduzir diretamente o corante vital MTT (MTT formazano) podem interferir nas medições da viabilidade dos tecidos e requerer a aplicação de controlos adaptados para correções. O tipo de controlos adaptados que podem ser necessários varia em função do tipo de interferência resultante do produto químico em estudo e do procedimento utilizado para medir o formazano MTT (ver pontos 25 a 31).

10. Embora o presente método de ensaio não forneça informações adequadas sobre a irritação da pele, deve notar-se que o método B.46 aborda especificamente a irritação cutânea *in vitro* e se baseia no mesmo sistema de ensaio de RhE, embora com outro protocolo (5). Para uma avaliação completa dos efeitos locais na pele após uma exposição única por via dérmica, deve consultar-se o documento de orientações da OCDE relativo a abordagens integradas de ensaio e avaliação da OCDE (6). Esta abordagem IATA inclui a realização de ensaios de corrosão cutânea *in vitro* (tal como descrito no presente método) e de irritação cutânea, antes de ponderar a realização de ensaios em animais vivos. Sabe-se que a utilização de pele humana está sujeita a condições e argumentos nacionais e internacionais de natureza ética.

PRINCÍPIO DO ENSAIO

11. O produto químico em estudo é aplicado localmente num modelo tridimensional de epiderme humana reconstruída, constituído por queratinócitos de epiderme humana não transformados, cultivados de modo a formarem um modelo com várias camadas e altamente diferenciado. Este é constituído por uma camada basal, uma camada espinhosa e uma camada granulosa organizadas e por um *stratum corneum* em várias camadas, com uma estrutura lipídica lamelar intercelular representativa das principais classes de lípidos, semelhante ao observado *in vivo*.

▼M8

12. O método de ensaio RhE baseia-se na premissa de que os produtos químicos corrosivos podem penetrar no *stratum corneum* por difusão ou erosão e são citotóxicos para as células das camadas subjacentes. A viabilidade celular é medida por conversão enzimática do corante vital MTT [brometo de 3-(4,5--dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio, azul de tiazolilo, n.º CAS 298-93-1] num sal azul de formazano, que é determinado quantitativamente depois de extraído dos tecidos (20). Os produtos químicos corrosivos são identificados pela sua capacidade de reduzir a viabilidade celular abaixo dos limiares definidos (ver pontos 35 e 36). O método de ensaio de corrosão cutânea baseado na epiderme humana reconstruída revelou-se capaz de prever efeitos de corrosão da pele *in vivo* avaliados em coelhos, de acordo com o método de ensaio B.4 (2).

DEMONSTRAÇÃO DE COMPETÊNCIA

13. Antes de utilizarem de forma rotineira qualquer um dos quatro modelos de ensaio de epiderme humana reconstruída validados conformes com o presente método de ensaio, os laboratórios devem demonstrar a sua competência técnica, classificando corretamente as doze substâncias de referência enumeradas no quadro 1. Caso seja utilizado um método para subclassificação, deve também demonstrar-se a correta subcategorização. Caso uma substância constante da lista esteja indisponível ou sempre que se justifique, pode utilizar-se outra substância para a qual existam dados adequados de referência *in vivo* e *in vitro* – por exemplo, da lista de produtos químicos de referência (24) –, desde que sejam aplicados os critérios de seleção descritos no quadro 1.

Quadro 1

Lista de substâncias de referência (1)

Substância	N.º CAS	Classe química (2)	Categoria GHS da ONU/CRE Com base em resultados *in vivo* (3)	MRV Cat. Com base em resultados *in vitro* (4)	MTT redutor (5)	Estado físico
Subcategoria 1A Corrosivos *in vivo*						
Ácido bromoacético	79-08-3	Ácido orgânico	1A	(3) 1A	—	S
Trifluoreto de boro di-hidratado	13319-75-0	Ácido inorgânico	1A	(3) 1A	—	L
Fenol	108-95-2	Fenol	1A	(3) 1A	—	S
Cloreto de dicloroacetilo	79-36-7	Eletrófilo	1A	(3) 1A	—	L
Combinação das subcategorias 1B e 1C de corrosivos *in vivo*						
Ácido glioxílico mono-hidratado	563-96-2	Ácido orgânico	1B e 1C	(3) 1B e 1C	—	S
Ácido lático	598-82-3	Ácido orgânico	1B e 1C	(3) 1B e 1C	—	L
Etanolamina	141-43-5	Base orgânica	1B	(3) 1B e 1C	Sim	Viscoso

▼**M8**

Substância	N.º CAS	Classe química (2)	Categoria GHS da ONU/CRE Com base em resultados *in vivo* (3)	MRV Cat. Com base em resultados *in vitro* (4)	MTT redutor (5)	Estado físico
Subcategoria 1A Corrosivos *in vivo*						
Ácido clorídrico (14,4 %)	7647-01-0	Ácido inorgânico	1B e 1C	(3) 1B e 1C	—	L
Não corrosivos *in vivo*						
Brometo de fenetilo	103-63-9	Eletrófilo	NC	(3) NC	Sim	L
4-Amino-1,2,4-triazol	584-13-4	Base orgânica	NC	(3) NC	—	S
4-(Metiltio)-benzaldeído	3446-89-7	Eletrófilo	NC	(3) NC	Sim	L
Ácido láurico	143-07-7	Ácido orgânico	NC	(3) NC	—	S

Abreviaturas: N.º CAS = número de registo do Chemical Abstracts Service; MRV = método de referência validado; NC = Não Corrosivo; S = sólido; L = líquido

(1) As substâncias de referência, divididas, em primeiro lugar, em substâncias corrosivas e não corrosivas e, depois, em subcategorias de corrosão e em classes químicas, foram selecionadas a partir das substâncias utilizadas nos estudos de validação ECVAM do EpiSkin™ e do EpiDerm™ (8) (9) (10), como em estudos pós-validação baseados em dados fornecidos pelos criadores do EpiSkin™ (22), do EpiDerm™, do SkinEthic™ e do epiCS® (23). Salvo indicação em contrário, as substâncias foram ensaiadas com o grau pureza da sua forma comercial (8) (10). A seleção inclui, na medida do possível, substâncias: (i) representativas da gama de respostas de corrosividade (p. ex., não corrosivas; fraca a forte corrosão) que o MRV é capaz de medir ou prever; (ii) representativas das classes de produtos químicos utilizados nos estudos de validação; (iii) com estruturas químicas bem definidas; (iv) que induzam resultados reprodutíveis no MRV; (v) que induzam resultados definitivos no método de ensaio de referência *in vivo*; (vi) disponíveis nos circuitos comerciais; e (vii) sem custos de eliminação proibitivos.

(2) Classe química atribuída por Barratt *et al*. (8).

(3) Os grupos de embalagem ONU correspondentes são, respetivamente, o I, II e III para as categorias 1A, 1B e 1C do GHS da ONU/CRE.

(4) As previsões *in vitro* de MRV validados contantes deste quadro foram obtidas com os modelos de ensaio EpiSkin™ e EpiDerm™(MRV) nos ensaios de pós-validação realizados pelos concetores do método de ensaio.

(5) Os valores de viabilidade obtidos nos estudos de validação de corrosão cutânea do ECVAM não foram corrigidos para redução direta do MTT (não foram realizados controlos aos animais mortos nos estudos de validação). No entanto, os dados pós-validação gerados pelos concetores dos métodos de ensaio que se apresentam neste quadro foram obtidos com base em controlos adaptados (23).

14. No âmbito da confirmação de competência, recomenda-se que o utilizador verifique, após a receção dos tecidos, as propriedades de barreira dos mesmos, especificadas pelo produtor do modelo de epiderme humana reconstruída. Este aspeto é especialmente importante se os tecidos forem expedidos a longas distâncias ou demorarem muito tempo a chegar. A partir do momento em que um método de ensaio esteja implantado e tenha sido demonstrada competência para utilizá-lo, não é necessário efetuar por rotina a referida verificação. Recomenda-se, contudo, que, ao utilizar um método de ensaio, se continue a avaliar periodicamente as propriedades de barreira.

PROCEDIMENTO

15. Apresenta-se em seguida uma descrição genérica dos componentes e procedimentos dos modelos de ensaio de epiderme humana reconstruída para avaliação da corrosão cutânea abrangidos pelo presente método de ensaio. Os modelos de epiderme humana reconstruída aprovados como cientificamente válidos para utilização neste método de ensaio, ou seja, os modelos EpiSkin™ (SM), EpiDerm™ (EPI-200), SkinEthic RHE™ e epiCS® (16)(17)(19)(28)(29)(30)(31)(32)(33), podem ser obtidos nos circuitos comerciais. Os procedimentos operacionais normalizados (PON) para estes quatro modelos de epiderme humana reconstruída estão disponíveis (34) (35) (36) (37); os principais componentes de método de ensaio são resumidos no

▼M8

apêndice 2. Recomenda-se que o respetivo PON seja consultado aquando da implementação e utilização de um desses modelos no laboratório. Os ensaios com os quatro modelos de ensaio de epiderme humana reconstruída abrangidos por este método devem respeitar o seguinte:

COMPONENTES DO MÉTODO DE ENSAIO DE EPIDERME HUMANA RECONSTRUÍDA

Condições gerais

16. Na reconstrução do epitélio, utilizam-se queratinócitos humanos não transformados. Devem estar presentes várias camadas de células epiteliais viáveis (camada basal, camada espinhosa, camada granulosa), sob um *stratum corneum* funcional. Este último deve ter várias camadas e possuir um perfil lipídico que permita estabelecer uma barreira funcional suficientemente robusta para resistir a uma penetração rápida de produtos químicos marcadores citotóxicos, por exemplo, SDS ou o Triton X-100. Deve demonstrar-se a função de barreira, que pode ser avaliada determinando a concentração à qual o produto químico de referência reduz a viabilidade dos tecidos em 50 % (IC_{50}) após um tempo de exposição fixo, ou determinando o tempo de exposição necessário para reduzir a viabilidade celular em 50 % (EF_{50}), mediante a aplicação do produto químico de referência a uma concentração especificada e fixa (ver ponto 18). As propriedades de contenção do modelo de epiderme humana reconstruída devem impedir a passagem de matéria para o tecido viável por contorno do *stratum corneum*, que redundaria numa modelação deficiente da exposição cutânea. O modelo de epiderme humana reconstruída não deve estar contaminado por bactérias, vírus, micoplasmas ou fungos.

Condições funcionais

Viabilidade

17. O ensaio MTS (27) é utilizado para quantificar a viabilidade dos tecidos. As células viáveis do tecido de epiderme humana reconstruída reduzem o corante vital MTT a um precipitado azul de formazano que é depois extraído do tecido com isopropanol ou um solvente semelhante. A densidade ótica do solvente de extração deve ser suficientemente reduzida (DO < 0,1). O formazano extraído pode ser quantificado utilizando um método de medição da absorvância normalizado ou espetrofotometria HPLC/UPLC (38). Os utilizadores do modelo de epiderme humana reconstruída devem garantir que cada lote de epiderme humana reconstruída utilizado preenche os critérios de controlo negativo. O concetor/fornecedor de epiderme humana reconstruída deve estabelecer um intervalo de aceitabilidade (limite superior e inferior) para os valores de controlo negativo da densidade ótica. Apresentam-se no quadro 2 os intervalos de aceitabilidade dos valores de controlo negativo da densidade ótica para os quatro modelos de ensaio validados incluídos no presente método de ensaio. Um utilizador de espetrofotometria HPLC/UPLC deve utilizar as gamas de controlo negativo da densidade ótica indicadas no quadro 2 como critério de aceitação para o controlo negativo. Deve documentar-se a estabilidade em cultura dos tecidos tratados com controlo negativo durante o período de exposição (fornecer medições de densidade ótica pertinentes).

Quadro 2

Intervalos de aceitabilidade dos valores de controlo negativo da densidade ótica para controlo da qualidade dos lotes

	Limite inferior de aceitabilidade	Limite superior de aceitabilidade
EpiSkin™ (SM)	> 0,6	< 1,5
EpiDerm™ SCT (EPI-200).	> 0,8	< 2,8
SkinEthic™ RHE	> 0,8	< 3,0
epiCS®	> 0,8	< 2,8

▼M8

Função de barreira

18. O *stratum corneum* e a sua composição lipídica devem ser suficientes para resistir a uma penetração rápida de certos produtos químicos marcadores citotóxicos (por exemplo, SDS ou Triton X-100), estimada com base na IC_{50} ou no ET_{50} (quadro 3). A função de barreira de cada lote do modelo de epiderme humana reconstruída deve ser demonstrada pelo concetor/vendedor do modelo de epiderme humana reconstruída aquando da entrega dos tecidos ao utilizador final (ver ponto 21).

Morfologia

19. No contexto do exame histológico do modelo RhE, a estrutura multicamadas análoga da epiderme humana deve conter camada basal, camada espinhosa, camada granulosa e *stratum corneum,* e exibir um perfil lipídico similar ao perfil lipídico da epiderme humana. O perfil histológico de cada lote do modelo de epiderme humana reconstruída deve ser fornecido pelo concetor/ /vendedor do modelo de epiderme humana reconstruída aquando da entrega dos tecidos ao utilizador final (ver ponto 21).

Reprodutibilidade

20. Os utilizadores do método de ensaio devem demonstrar a reprodutibilidade do mesmo ao longo do tempo, com os controlos positivos e negativos. Além disso, o método de teste deve ser usado somente se o criador/fornecedor modelo RhE fornecer dados que demonstrem a reprodutibilidade ao longo do tempo com produtos químicos corrosivos e não corrosivos, por exemplo, constantes da lista de substâncias de referência (quadro 1). Caso seja utilizado um método de ensaio para a subcategorização, deve igualmente demonstrar-se a reprodutibilidade no que respeita a esta última.

Controlo de qualidade

21. O modelo de epiderme humana reconstruída só deve ser utilizado se o concetor/fornecedor demonstrar que cada lote do modelo de epiderme humana reconstruída satisfaz determinados critérios de aptidão, dos quais os de viabilidade (ponto 17), função de barreira (ponto 18) e morfologia (ponto 19) são os mais importantes. Estes dados são fornecidos aos utilizadores do método para que estes possam incluir tais informações no relatório de ensaio. Só os resultados obtidos com lotes de tecidos QC aceites podem ser utilizados para a previsão fiável da classificação corrosiva. O criador/fornecedor de epiderme humana reconstruída estabelece um intervalo de aceitabilidade (limite superior e inferior) para IC_{50} ou TE_{50}. Indicam-se no quadro 3 os intervalos de aceitabilidade para os quatro modelos de ensaio validados.

Quadro 3

Critérios de controlo da qualidade para liberação dos lotes

	Limite inferior de aceitabilidade	Limite superior de aceitabilidade
EpiSkin™ (SM) (18 horas de tratamento com (SDS) (33)	IC_{50} = 1,0 mg/ml	IC_{50} = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SCT (EPI-200). (1 % Triton X-100) (34)	ET_{50} = 4,0 horas	ET_{50} = 8,7 horas
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100) (35)	ET_{50} = 4,0 horas	ET_{50} = 10,0 horas
epiCS® (1 % Triton X-100) (36)	ET_{50} = 2,0 horas	ET_{50} = 7,0 horas

▼M8

Aplicação dos produtos químicos em estudo e de controlo

22. Devem usar-se, pelo menos, dois tecidos replicados para cada produto químico em estudo, bem como controlos para cada período de exposição. Tanto no caso dos líquidos como dos sólidos, deve aplicar-se uma quantidade do produto químico em estudo suficiente para cobrir uniformemente a superfície da epiderme, evitando uma dose infinita, ou seja, no mínimo 70 µl/cm^2 ou 30 mg/cm^2. Consoante os modelos, a superfície da epiderme deve ser humidificada com água desionizada ou destilada antes da aplicação de produtos químicos sólidos, para melhorar o contacto entre o produto químico em estudo e a superfície da epiderme (34) (35) (36) (37). Sempre que possível, os sólidos devem ser aplicados na forma de pó fino. O método de aplicação deve ser adequado ao produto químico em estudo – ver, por exemplo, as referências (34-37). Após o período de exposição, o produto em estudo deve ser cuidadosamente removido da superfície da epiderme, por lavagem com uma solução-tampão aquosa ou uma solução a 0,9 % de NaCl. Dependendo de qual dos quatro modelos de ensaio de epiderme humana reconstruída validados for utilizado, aplicam-se dois ou três períodos de exposição por produto químico em estudo (para os quatro modelos válidos de epiderme humana reconstruída: 3 min e 1 hora; para EpiSkin™ um tempo de exposição adicional de 4 horas). Em função do modelo de ensaio de epiderme humana reconstruída e do período de exposição avaliado, a temperatura de incubação durante a exposição pode variar entre a temperatura ambiente e 37 °C.

23. Cada ensaio deve utilizar amostras de controlo negativas e positivas em paralelo, a fim de demonstrar que a viabilidade (com controlos negativos), a função de barreira e a consequente sensibilidade (com o produto químico de controlo positivo) dos tecidos se situam dentro de um intervalo de aceitabilidade histórico definido. Os produtos químicos de controlo positivo propostos são o ácido acético glacial ou KOH 8 N, em função do modelo de epiderme humana reconstruída. É de notar que o KOH 8 N é um redutor direto do MTT e pode exigir controlos adaptados, como se descreve nos pontos 25 e 26. Os controlos negativos sugeridos são uma solução a 0,9 % (m/v) de NaCl ou água.

Medição da viabilidade celular

24. Deve utilizar-se o ensaio do MTT, quantitativo, para medir a viabilidade celular no âmbito do presente método (27). Coloca-se a amostra dos tecidos numa solução de MTT de concentração apropriada (0,3 ou 1 mg/ml), durante 3 horas. O precipitado azul de formazano é depois extraído do tecido com um solvente (por exemplo, isopropanol ou isopropanol acidificado), medindo-se a concentração de formazano por determinação da densidade ótica a 570 nm, utilizando um intervalo de banda de filtro de±30 nm, ou HPLC/espetrofotometria (ver pontos 30 e 31) (38).

25. Os produtos químicos em estudo podem interferir com o ensaio do MTT, por redução direta do MTT a formazano, de cor azul, e/ou por interferência das cores, se o produto químico em estudo absorver naturalmente, ou devido a processos de tratamento, na mesma gama de DO de formazano (570 ±30 nm, principalmente produtos químicos azuis e púrpura). Devem realizar-se controlos adicionais para detetar e corrigir uma possível interferência destes produtos químicos, como a redução não específica do MTT (NSMTT) e o controlo da cor não específico (NSC) (ver pontos 26-30). Este aspeto é especialmente importante se o produto químico em estudo não for completamente removido do tecido por lavagem ou penetrar na epiderme, estando presente nos tecidos quando é realizado o ensaio de viabilidade do MTT. Os PON para os modelos de ensaio (34) (35) (36) (37) contêm uma descrição pormenorizada do modo de correção da redução direta do MTT e das interferências de agentes corantes.

▼M8

26. Para identificar os redutores diretos do MTT, adiciona-se cada produto químico em estudo a um meio MTT recentemente preparado (34) (35) (36) (37). Se a mistura de MTT que contém o produto químico em estudo se tornar azul/púrpura, considera-se que o produto químico em estudo reduz diretamente o MTT e é necessário realizar uma verificação funcional sobre epiderme não viável, independentemente da medição da absorvância normalizada ou do recurso à espetrofotometria HPLC/UPLC. Este controlo funcional complementar utiliza tecidos mortos que apenas possuem atividade metabólica residual, mas que absorvem o produto químico em estudo a uma taxa semelhante à dos tecidos viáveis. Cada substância química redutora do MTT é aplicada em, pelo menos, dois replicados dos tecidos sujeitos a occisão por cada tempo de exposição, que devem ser submetidos a todo o ensaio de corrosão cutânea. A viabilidade real do tecido é então calculada como a percentagem de viabilidade dos tecidos obtida com os tecidos vivos expostos ao MTT, menos a percentagem de redução não específica do MTT, obtida com os tecidos occisados expostos ao mesmo redutor do MTT, em relação ao controlo negativo concomitante à correção do teste (% NSMTT).

27. Para identificar eventuais interferências de produtos em estudo químicos coloridos ou que adquirem cor quando entram em contacto com a água ou com isopropanol, e determinar a necessidade de controlos complementares, deve efetuar-se uma análise espetral do produto químico em estudo dissolvido em água (ambiente durante a exposição) e/ou em isopropanol (solução de extração). Se a solução do produto químico em estudo em água e/ou em isopropanol absorver luz na gama de 570 ±30 nm, devem efetuar-se novos controlos de corante ou, em alternativa, recorrer à espetrofotometria HPLC/ /UPLC, caso em que estes controlos não são exigidos (ver pontos 30 e 31). Ao medir a absorvância-padrão, aplica-se o produto químico colorido em estudo que interfere em, pelo menos, dois tecidos replicados viáveis por cada período de exposição, os quais são sujeitos a um ensaio de corrosão integral da pele, mas são incubados num meio, em vez de o serem numa solução redutora do MTT, durante a fase de incubação do MTT, para se obter um controlo da cor não específico (NSC_{vivo}). O controlo do nível do NCS_{vivo} tem de ser realizado simultaneamente, ao longo do período de exposição, em cada série de ensaios, por produto químico colorido, devido à variabilidade biológica inerente dos tecidos vivos. A viabilidade real do tecido é então determinada como a percentagem de viabilidade dos tecidos obtida com tecidos vivos expostos ao produto químico suscetível de interferir no ensaio e incubados com a solução de MTT, menos a percentagem de cor não específica obtida com tecidos vivos expostos ao produto químico que interfere no ensaio e incubados sem MTT, em simultâneo com a correção do ensaio (% de NCS_{vivo}).

28. Os produtos químicos em estudo identificados como provocando uma redução direta do MTT (ver ponto 26) e interferências de cor (ver ponto 27) exigirão igualmente um terceiro conjunto de controlos, para além dos controlos de NSMTT e NCS_{vivo} descritos nos pontos anteriores, aquando da medição da absorvância-padrão (DO). Tal é normalmente o caso dos produtos químicos de cor escura que interferem com o ensaio do MTT (por exemplo, de cor azul, púrpura ou preta), uma vez que a sua cor intrínseca impede a avaliação da capacidade de reduzirem diretamente o MTT, conforme descrito no ponto 26. Os produtos químicos em estudo podem ligar-se a tecidos vivos e sujeitos a occisão, pelo que o controlo do NSMTT permite não só corrigir uma potencial redução direta do MTT pelo produto químico em estudo, como também uma interferência de cor resultante da ligação do produto químico aos tecidos sujeitos a occisão. Pode, assim, obter-se uma dupla correção para as interferências de cor, uma vez que o controlo NCS_{vivo} corrige já as interferências de cor resultantes da ligação do produto químico em estudo aos tecidos vivos. Para evitar uma eventual dupla correção para a interferência da cor, é necessário realizar um terceiro controlo da cor não específico dos tecidos sujeitos a occisão («NSCmorto»). Neste controlo adicional, aplica-se o produto químico em estudo em, pelo menos, dois replicados dos tecidos sujeitos a occisão por período de exposição, replicados

▼M8

esses que são submetidos à totalidade do procedimento de ensaio, mas são incubados com meio durante a etapa de incubação com MTT, em vez da solução de MTT. Um único NSC_{morto} controlado é suficiente por produto químico em estudo, independentemente do número de ensaios ou dos ensaios independentes realizados, mas deve ser realizado em conjunto com o controlo do NSMTT e, sempre que possível, com o mesmo lote de tecidos. A viabilidade real do tecido é então calculada como a percentagem de viabilidade dos tecidos obtida com tecidos vivos expostos ao produto químico em estudo menos a percentagem de NSMTT menos a percentagem de NSC_{vivo} mais a percentagem não específica obtida com tecidos mortos expostos ao produto químico em causa e incubados em meio sem MTT, calculada em relação à amostra do controlo negativo realizado em simultâneo com a correção do ensaio (% NSC_{morto}).

29. É importante assinalar que a redução não específica do MTT e as interferências de cor não específicas podem aumentar as leituras do extrato de tecido acima da gama de linearidade do espetrofotómetro. Nesta base, cada laboratório deve determinar a gama de linearidade do respetivo espetrofotómetro com o formazano (n.º CAS 57360-69-7), a partir de uma fonte comercial, antes de se iniciar o ensaio de produtos químicos para fins regulamentares. Considera-se que a medição da absorvância-padrão (DO) por recurso a um espetrofotómetro é adequada para avaliar os redutores diretos do MTT e os produtos químicos que interferem com os mesmos, se as DO dos extratos de tecidos obtidos com o produto químico em estudo, sem qualquer correção de redução direta do MTT e/ou da diminuição da cor se situarem na gama linear do espetrofotómetro ou se a percentagem de viabilidade não corrigida obtida com o produto químico em estudo já o tiver definido como corrosivo (ver pontos 35 e 36). No entanto, os resultados relativos aos produtos químicos em estudo que produzem %NSMTT e/ou % NSC_{vivo} > 50 % da amostra de controlo negativo devem ser interpretados com prudência.

30. No caso dos produtos químicos coloridos incompatíveis com a medição da absorvância-padrão (DO) devido a interferências demasiado fortes com o método MTT, pode recorrer-se ao método por espetrofotometria HPLC/ /UPLC para determinar o formazano (ver ponto 31) (37). A espetrofotometria HPLC/UPLC deteta a separação do formazano do produto químico em estudo antes da sua quantificação (38). Por este motivo, nunca são necessários controlos NSCvivo ou NSCmorto quando se utiliza espetrofotometria HPLC/ /UPLC, independentemente do produto químico em estudo. Contudo, devem utilizar-se controlos NSMTT se se suspeitar que o produto químico em estudo reduz diretamente o MTT, ou se apresentar uma cor que impeça a avaliação da capacidade de reduzir diretamente o MTT (conforme descrito no ponto 26). Caso se utilize a espetrofotometria HPLC/UPLC para determinar o formazano, a percentagem de viabilidade do tecido é calculada como percentagem de todos os picos de formazano obtidos com tecidos vivos expostos ao produto químico em estudo em relação a um pico obtido em paralelo com o controlo negativo. Para os produtos químicos em estudo capazes de reduzir diretamente o MTT, a viabilidade dos tecidos é calculada como a percentagem de viabilidade dos tecidos obtida com tecidos vivos expostos ao produto químico em estudo menos a percentagem de NSMTT. Por último, é de referir que não é possível avaliar os redutores diretos do MTT, passíveis de interferirem também com as cores, retidos nos tecidos após o tratamento e que reduzem o MTT de tal forma que conduzem a DO (utilizando a medida normal de DO) ou áreas de picos (utilizando espetrofotometria UPLC/HPLC) fora do intervalo de linearidade dos aparelhos, embora tais ocorrências sejam muito raras.

▼M8

31. A espetrofotometria HPLC/UPLC pode também ser utilizada para a determinação de formazano com todos os tipos de produtos químicos em estudo (redutores de MTT ou não) (38). Devido à diversidade dos sistemas de espetrofotometria HPLC/UPLC, a qualificação do sistema de espetrofotometria HPLC/UPLC deve ser demonstrada antes da sua utilização para quantificar o formazano em extratos de tecidos através do cumprimento dos critérios de aceitação de um conjunto de parâmetros de qualificação normalizados baseados descritos na *U.S. Food and Drug Administration guidance for industry on bio-analytical method validation*. Estes parâmetros-chave e os respetivos critérios de aceitação constam do apêndice 4. Se forem cumpridos os critérios de aceitação definidos neste apêndice, considera-se o sistema de espetrofotometria HPLC/UPLC qualificado para medir o formazano nas condições experimentais descritas no presente método de ensaio.

Critérios de aceitabilidade

32. Para cada método de ensaio que utiliza modelos válidos de epiderme humana reconstruída, os tecidos tratados com o controlo negativo devem apresentar uma densidade ótica que reflita a qualidade dos tecidos descrita no quadro 2 e não estar abaixo dos limites históricos. Os tecidos tratados com o controlo positivo (ácido acético glacial ou KOH 8 N) devem refletir a capacidade de resposta a um produto químico corrosivo nas condições do modelo de teste (ver apêndice 2). A variabilidade entre os tecidos replicados do produto químico em estudo e/ou dos produtos químicos de controlo deve situar-se dentro dos limites aceites para cada modelo válido de epiderme humana reconstruída (ver apêndice 2); por exemplo, a diferença de viabilidade entre os dois tecidos replicados não deve exceder 30 %. Se o controlo, negativo ou positivo, estiver fora do intervalos aceites, a série de ensaios é considerada não qualificada e deve ser repetida. Se a variabilidade dos produtos químicos em estudo se situar fora do intervalo definido, os ensaios devem ser repetidos.

Interpretação dos resultados e modelo de previsão

33. Os valores de densidade ótica obtidos para cada produto químico em estudo devem ser utilizados para calcular a percentagem de viabilidade relativa ao controlo negativo, fixada em 100 %. Caso se recorra à espetrofotometria HPLC/UPLC, a percentagem de viabilidade do tecido é calculada como a percentagem de todos os picos de formazano obtidos com tecidos vivos expostos ao produto químico em estudo em relação a um pico obtido em paralelo, com o controlo negativo. Os valores percentuais do limiar de viabilidade celular que distinguem os produtos químicos em estudo corrosivos dos não corrosivos (ou diferenciam subcategorias de produtos corrosivos) são definidos nos pontos 35 e 36 para cada um dos modelos de ensaio abrangidos por este método, e devem ser utilizados para interpretar os resultados.

34. Se a classificação resultante for inequívoca, deve bastar um único ensaio composto por, pelo menos, dois tecidos replicados para o produto químico em estudo. No entanto, em caso de resultados inconclusivos (por exemplo, medições discordantes dos replicados), pode ponderar-se efetuar uma segunda série de ensaios, bem como uma terceira, se os resultados das duas primeiras séries forem discordantes.

35. O modelo de previsão do modelo de ensaio de corrosão cutânea EpiSkin™ (9) (34) (22), associado ao sistema de classificação GHS da ONU/CRE, é apresentado no quadro 4:

▼M8

Quadro 4

Modelo de previsão de EpiSkin™

Viabilidade medida após o tempo de exposição (t = 3, 60 e 240 minutos)	Previsão a ter em conta
< 35 % após 3 min de exposição	**Corrosivo:** • Subcategoria facultativa 1A (*)
≥ 35 % após 3 min de exposição < 35 % após 60 min de exposição **OU** ≥ 35 % após 60 min de exposição < 35 % após 240 min de exposição	**Corrosivo:** • Uma combinação das subcategorias facultativas 1B e 1C
≥ 35 % após 240 min de exposição	**Não corrosivo**

(*) De acordo com os dados gerados para avaliar a utilidade dos modelos de ensaio de epiderme humana reconstruída, demonstrou-se que cerca de 22 % dos resultados da subcategoria 1A do modelo de teste EpiSkin™ podem, na realidade, inserir-se nas subcategorias 1B ou 1C de substâncias/misturas (constituindo, assim, sobreclassificações) (ver apêndice 3).

36. Os modelos de previsão para os modelos de ensaios de corrosão cutânea de EpiDerm™ SCT (10)(23)(35), the SkinEthic™ RHE (17)(18) (23) (36) e epiCS® (16)(23)(37), associados ao sistema de classificação GHS da ONU/ /CRE, são apresentados no quadro 5:

Quadro 5

EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE e epiCS®

Viabilidade medida após o tempo de exposição (t = 3 e 60 minutos)	Previsão a ter em conta
ETAPA 1 para os métodos EpiDerm™ SCT, for SkinEthic™ RHE and epiCS®	
< 50 % após 3 min de exposição	**Corrosivo**
≥ 50 % após 3 min de exposição **E** < 15 % após 60 min de exposição	**Corrosivo**
≥ 50 % após 3 min de exposição **E** ≥ 15 % após 60 min de exposição	**Não corrosivo**
ETAPA 2 para o método EpiDerm™ SCT — para substâncias/misturas identificadas como corrosivas na etapa 1	
< 25 % após 3 min de exposição	Subcategoria facultativa 1A*
≥ 25 % após 3 min de exposição	Uma combinação das subcategorias facultativas 1B e 1C
ETAPA 2 para SkinEthic™ RHE — para substâncias/misturas identificadas como corrosivas na etapa 1	
< 18 % após 3 min de exposição	Subcategoria facultativa 1A*

▼M8

Viabilidade medida após o tempo de exposição (t = 3 e 60 minutos)	Previsão a ter em conta
ETAPA 1 para os métodos EpiDerm™ SCT, for SkinEthic™ RHE and epiCS®	
≥ 18 % após 3 min de exposição	Uma combinação das subcategorias facultativas 1B e 1C
ETAPA 2 para epiCS ® — para substâncias/misturas identificadas como corrosivas na etapa 1	
< 15 % após 3 min de exposição	Subcategoria facultativa 1A*
≥ 15 % após 3 min de exposição	Uma combinação das subcategorias facultativas 1B e 1C

DADOS E RELATÓRIOS

Dados

37. Para cada ensaio, devem ser apresentados num quadro os dados respeitantes a cada replicado de tecido (por exemplo, valores de densidade ótica e percentagens de viabilidade celular calculadas para cada produto químico em estudo, bem como a classificação correspondente), incluindo os dados relativos às repetições de ensaios eventualmente efetuadas. Além disso, devem ser comunicados os meios e intervalos de viabilidade e os CV entre os tecidos replicados, para cada ensaio. Para cada produto químico em estudo, devem indicar-se as interações observadas com o reagente MTT por redutores diretos deste ou por produtos químicos com cor.

Relatório de ensaio

38. O relatório de ensaio deve conter as seguintes informações:

Produtos químicos em estudo e de controlo

— Substância monocomponente: dados de identificação química, como as denominações IUPAC ou CAS, número CAS, código SMILES ou InChI, fórmula estrutural, pureza, identidade química das impurezas, caso se justifique e seja exequível, etc.;

— Substância multicomponentes, UVCB e mistura: caracterizada, na medida do possível, pela identidade química (ver acima), ocorrência quantitativa e principais propriedades físico-químicas dos componentes;

— Aspeto físico, hidrossolubilidade e outras propriedades físico-químicas pertinentes;

— Proveniência, número do lote, se disponíveis;

— Tratamento do produto químico em estudo/substância de controlo antes do ensaio, se for o caso;

— Estabilidade do produto químico em estudo, data-limite de utilização ou data de reanálise, se conhecidas.

— Condições de armazenagem.

Modelo de epiderme humana reconstruída, protocolo utilizado e fundamentação do mesmo (se aplicável)

Condições de realização do ensaio

— Modelo de epiderme humana reconstruída utilizado (incluindo número do lote);

▼**M8**

— Informações sobre a calibração do dispositivo de medição (por exemplo, espetrofotómetro), o comprimento de onda e a gama de comprimentos de onda (se pertinente) utilizados para a quantificação do MTT formazano, e o intervalo de linearidade do dispositivo de medição;

— Descrição do método utilizado para quantificar o MTT formazano;

— Descrição da qualificação do sistema de sistema de espetrofotometria HPLC/UPLC, se pertinente;

— Informações completas que substanciem o modelo específico de epiderme humana reconstruída utilizado, incluindo dados sobre o desempenho do mesmo. Tal deve incluir, nomeadamente, o seguinte:

i) Viabilidade;

ii) Função de barreira;

iii) Morfologia;

iv) Capacidade de reprodutibilidade e de previsão;

v) Controlos de qualidade (CQ) do modelo;

— Referência a dados anteriormente publicados sobre o modelo; tal deve incluir, nomeadamente, o seguinte Aceitabilidade dos dados de controlo de qualidade relativamente a dados históricos de lotes;

— Demonstração da competência na execução do método de ensaio antes da sua utilização por rotina através do ensaio das substâncias de referência.

Procedimento de ensaio

— Pormenores sobre o procedimento de ensaio utilizado (incluindo procedimentos de lavagem utilizados após o período de exposição);

— Doses do produto químico em estudo e dos produtos químicos de controlo utilizados;

— Duração do(s) período(s) de exposição e temperatura(s) de exposição;

— Indicação dos controlos utilizados nos redutores diretos do MTT e/ou dos produtos químicos em estudo que apresentem coloração, se aplicável;

— Número de replicados de tecidos utilizados por cada produto químico em estudo e de controlo (CP, controlo negativo, NSMTT e NSC-vivo e NSC-morto, se aplicável), por período de exposição;

— Descrição do modelo de critérios/previsão de decisão aplicado com base no modelo de epiderme humana reconstruída utilizado;

— Descrição de eventuais modificações do procedimento de ensaio (incluindo os procedimentos de lavagem).

Critérios de aceitação de série de ensaios e de ensaios

— Valores médios dos controlos positivos e negativos e intervalos de aceitação com base em dados históricos;

— Variabilidade aceitável entre os tecidos replicados para os controlos positivos e negativos;

▼M8

— Variabilidade aceitável entre os tecidos replicados para o produto químico em estudo.

Resultados

— Quadro com os dados correspondentes aos produtos químicos em estudo e aos controlos, para cada período de exposição, cada série de ensaios e cada série e cada medição de replicados, incluindo a densidade ótica (DO) ou a zona do pico do formazano, a percentagem de viabilidade dos tecidos, a percentagem média de viabilidade dos tecidos, diferenças entre os replicados, ou, se for caso disso, DP e/ou CV;

— Quadro com os dados correspondentes aos produtos químicos em estudo e aos controlos, para cada período de exposição, cada série de ensaios e cada série e cada medição de replicados, incluindo a densidade ótica (DO) ou a zona do pico do formazano, a percentagem de viabilidade dos tecidos, a percentagem média de viabilidade dos tecidos, diferenças entre os replicados, ou, se for caso disso, DP e/ou os CV;

— Resultados obtidos com o(s) produto(s) químico(s) em estudo e produtos químicos de controlo à luz dos critérios de aceitação de ensaios e séries de ensaios definidos;

— Descrição de outros efeitos eventualmente observados;

— Classificação atribuída, mencionando o modelo de previsão ou os critérios de decisão utilizados.

Discussão dos resultados

Conclusões

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(1) ONU (2013). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth Revised Edition, UN New York and Geneva. Disponível em: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html

(2) Capítulo B.4 deste anexo, «Toxicidade aguda: irritação/corrosão dérmica»

(3) Capítulo B.40 deste anexo, «Corrosão da pele *in vitro*».

(4) Capítulo B.65 deste anexo: «Método de ensaio da membrana de estanquidade *in vitro*»

(5) Capítulo B.46 deste anexo, «Corrosão da pele *in vitro*: Método de ensaio em epiderme humana reconstruída».

(6) OCDE (2014). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment of Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(7) Botham P.A., Chamberlain M., Barratt M.D., Curren R.D., Esdaile D.J., Gardner J.R., Gordon V.C., Hildebrand B., Lewis R.W., Liebsch M., Logemann P., Osborne R., Ponec M., Regnier J.F., Steiling W., Walker A.P., and Balls M. (1995). A Prevalidation Study on *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. The report and Recommendations of ECVAM Workshop *6.ATLA* 23:219-255.

(8) Barratt M.D., Brantom P.G., Fentem J.H., Gerner I., Walker A.P., and Worth A.P. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 1. Selection and distribution of the Test Chemicals. *Toxicol.In Vitro* 12:471-482.

▼**M8**

(9) Fentem J.H., Archer G.E.B., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdaile D.J., Holzhutter H.-G., and Liebsch M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for SkinCorrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. Toxicol.in Vitro 12:483-524.

(10) Liebsch M., Traue D., Barrabas C., Spielmann H., Uphill, P., Wilkins S., Wiemann C., Kaufmann T., Remmele M. and Holzhütter H. G. (2000). The ECVAM Prevalidation Study on the Use of EpiDerm for Skin Corrosivity Testing, *ATLA* 28: 371-401.

(11) Balls M., Blaauboer B.J., Fentem J.H., Bruner L., Combes R.D., Ekwall B., Fielder R.J., Guillouzo A., Lewis R.W., Lovell D.P., Reinhardt C.A., Repetto G., Sladowski D., Spielmann H. et Zucco F. (1995). Practical Aspects of the Validation of Toxicity Test Procedures. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops, ATLA 23:129--147.

(12) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological TestMethods. NIH Publication No 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.

(13) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (2002). ICCVAM evaluation of EpiDerm™ (EPI--200), EPISKIN™ (SM), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Assay: *In Vitro* Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. NIH Publication No 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.

(14) EC-ECVAM (1998). Statement on the Scientific Validity of the EpiSkin™ Test (an *In Vitro* Test for Skin Corrosivity), Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC10), 3 April 1998.

(15) EC-ECVAM (2000). Statement on the Application of the EpiDerm™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC14), 21 March 2000.

(16) Hoffmann J., Heisler E., Karpinski S., Losse J., Thomas D., Siefken W., Ahr H.J., Vohr H.W. and Fuchs H.W. (2005). Epidermal-Skin-Test 1000 (EST-1000)-A New Reconstructed Epidermis for *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. *Toxicol.In Vitro* 19: 925-929.

(17) Kandárová H., Liebsch M., Spielmann,H., Genschow E., Schmidt E., Traue D., Guest R., Whittingham A., Warren N, Gamer A.O., Remmele M., Kaufmann T., Wittmer E., De Wever B., and Rosdy M. (2006). Assessment of the Human Epidermis Model SkinEthic RHE for *In Vitro* Skin Corrosion Testing of Chemicals According to New OECD TG 431. *Toxicol.In Vitro* 20: 547-559.

(18) Tornier C., Roquet M. and Fraissinette A.B. (2010). Adaptation of the Validated SkinEthic™ Reconstructed Human Epidermis (RHE) Skin Corrosion Test Method to 0,5 cm^2 Tissue Sample. *Toxicol. In Vitro* 24: 1379-1385.

(19) EC-ECVAM (2006). Statement on the Application of the SkinEthic™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC25), 17 November 2006.

(20) EC-ECVAM (2009). ESAC Statement on the Scientific Validity of an *In-Vitro* Test Method for Skin Corrosivity Testing: the EST-1000, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC30), 12 June 2009.

▼**M8**

(21) OCDE (2013). Summary Document on the Statistical Performance of Methods in OECD Test Guideline 431 for Sub-categorisation. Environment, Health, and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 190). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(22) Alépée N., Grandidier M.H., and Cotovio J. (2014). Sub-Categorisation of Skin Corrosive Chemicals by the EpiSkin™ Reconstructed Human Epidermis Skin Corrosion Test Method According to UN GHS: Revision of OECD Test Guideline 431. *Toxicol. In Vitro* 28:131-145.

(23) Desprez B., Barroso J., Griesinger C., Kandárová H., Alépée N., and Fuchs, H. (2015). Two Novel Prediction Models Improve Predictions of Skin Corrosive Sub-categories by Test Methods of OECD Test Guideline No 431. *Toxicol. In Vitro* 29:2055-2080.

(24) OCDE (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human Epidermis (RHE) Test Methods For Skin Corrosion in Relation to OECD TG 431. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 219). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris

(25) OCDE (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(26) Eskes C. *et al.* (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data Within the European Framework: Workshop Recommendations. *Regul.Toxicol.Pharmacol.* 62:393-403.

(27) Mosmann T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65:55-63.

(28) Tinois E., *et al.* (1994). The Episkin Model: Successful Reconstruction of Human *Epidermis In Vitro.* In: *In Vitro* Skin Toxicology. Rougier A.,. Goldberg A.M and Maibach H.I. (Eds): 133-140.

(29) Cannon C. L., Neal P.J., Southee J.A., Kubilus J. and Klausner M. (1994), New Epidermal Model for Dermal Irritancy Testing. *Toxicol.in Vitro* 8:889 - 891.

(30) Ponec M., Boelsma E, Weerheim A, Mulder A, Bouwstra J and Mommaas M. (2000). Lipid and Ultrastructural Characterization of Reconstructed Skin Models. Inter. J. Pharmaceu. 203:211 - 225.

(31) Tinois E., Tillier, J., Gaucherand, M., Dumas, H., Tardy, M. and Thivolet J. (1991). *In Vitro* and Post - Transplantation Differentiation of Human Keratinocytes Grown on the Human Type IV Collagen Film of a Bilayered Dermal Substitute. *Exp. Cell Res.* 193:310-319.

(32) Parenteau N.L., Bilbo P, Nolte CJ, Mason VS and Rosenberg M. (1992). The Organotypic Culture of Human Skin Keratinocytes and Fibroblasts to Achieve Form and Function. *Cytotech.* 9:163-171.

(33) Wilkins L.M., Watson SR, Prosky SJ, Meunier SF and Parenteau N.L. (1994). Development of a Bilayered Living Skin Construct for Clinical Applications. *Biotech. Bioeng.* 43/8*:*747-756.

(34) EpiSkin™ SOP (December 2011). *INVITTOX* Protocol (No 118). EpiSkin™ Skin Corrosivity Test.

(35) EpiDerm™ SOP (February 2012). Version MK-24-007-0024 Protocol for: *In Vitro* EpiDerm™ Skin Corrosion Test (EPI-200-SCT), for Use with MatTek Corporation's Reconstructed Human Epidermal Model EpiDerm.

▼**M8**

(36) SkinEthic™ RHE SOP (January 2012). *INVITTOX* Protocol SkinEthic™ Skin Corrosivity Test.

(37) EpiCS® SOP (January 2012). Version 4.1 *In Vitro* Skin Corrosion: Human Skin Model Test Epidermal Skin Test 1000 (epiCS®) CellSystems.

(38) Alépée N., Barroso J., De Smedt A., De Wever B., Hibatallah J., Klaric M., Mewes K.R., Millet M., Pfannenbecker U., Tailhardat M., Templier M., and McNamee P. Use of HPLC/UPLC- spectrophotometry for Detection of MTT Formazan in In Vitro Reconstructed Human Tissue (RhT)- based Test Methods Employing the MTT Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 29: 741-761.

(39) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. (May 2001). Disponível em: [http://www.fda.gov/ /downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf].

▼**M8**

Apêndice 1

DEFINIÇÕES

Adequação: Relação do método de ensaio com o efeito em causa; pertinência e utilidade do ensaio para o fim em vista. Traduz a medida em que o método de ensaio mede ou prevê corretamente o efeito biológico em causa. A adequação compreende a exatidão (concordância) do método de ensaio (25).

Concordância: Mede o desempenho do método de ensaio no caso dos métodos cujos resultados sejam estabelecidos em função de categorias e constitui um dos aspetos da adequação. Este termo e o termo «exatidão» são muitas vezes utilizados indistintamente para indicar a proporção de produtos químicos testados que são corretamente classificados como positivos ou negativos. A concordância é altamente dependente da prevalência do produto químico em estudos positivos para o tipo de produto químico em estudo (25).

Controlo NSC_{morto}: Controlo de cor não específico em tecidos mortos.

Controlo NSC_{vivo}: Controlo da cor não específico nos tecidos vivos.

Corrosão da pele *in vivo*: Produção de danos irreversíveis à pele, nomeadamente a necrose visível da epiderme, prolongando-se para a derme, após a aplicação de um produto químico em estudo durante um máximo de quatro horas. As reações corrosivas típicas são úlceras, sangramento, crostas ensanguentadas e, após o período de observação de 14 dias, empalidecimento devido à descoloração da pele, áreas alargadas de alopecia e cicatrizes. As lesões duvidosas poderão ser esclarecidas por métodos histopatológicos.

CP: Controlo positivo, replicado que contém todos os componentes do sistema de ensaio e foi tratado com um produto químico que comprovadamente induz reação positiva. Para que possa determinar-se a variabilidade no tempo da reação a esta amostra de controlo, essa reação não deve ser excessivamente positiva.

DO: Densidade ótica.

Dose infinita: Quantidade de produto químico em estudo aplicada à epiderme que excede a quantidade necessária para cobrir completa e uniformemente a superfície da epiderme.

Especificidade: Proporção dos produtos químicos negativos/inativos que são corretamente classificados pelo método de ensaio. Constitui uma medida da exatidão de um método de ensaio cujos resultados sejam estabelecidos em função de categorias e é um aspeto importante a ter em conta na avaliação da adequação do método de ensaio (25).

Exatidão: Grau de acordo entre os resultados do método de ensaio e os valores de referência aceites. Constitui uma medida do desempenho do método e um dos aspetos da adequação. Este termo e o termo «concordância» são muitas vezes utilizados indistintamente para indicar a proporção de resultados corretos de um método de ensaio (25).

ET_{50}: Pode ser estimado determinando o tempo de exposição necessário para reduzir a viabilidade celular em 50 %, após aplicação de uma dada concentração fixa de um marcador químico; ver também IC_{50}.

Fiabilidade: Medida em que, utilizando o mesmo protocolo, um método de ensaio pode ser continuadamente reproduzido no mesmo laboratório e em laboratórios diferentes. A fiabilidade é avaliada com base nos valores calculados das reprodutibilidades intralaboratorial e interlaboratorial (25).

▼M8

GHS (Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos): Sistema que propõe a classificação dos produtos químicos (substâncias e misturas) em função de tipos e níveis normalizados de perigos físicos, sanitários e ambientais e trata ainda dos correspondentes elementos de comunicação, como pictogramas, palavras-sinal, advertências de perigo, recomendações de prudência e fichas de dados de segurança, de modo a transmitir informações sobre os efeitos indesejáveis do produto em causa, com vista à proteção das pessoas (empregadores, trabalhadores, transportadores, consumidores, pessoal dos serviços de emergência, etc.) e do ambiente (1).

HPLC: Cromatografia líquida de alta resolução.

IATA: Abordagem integrada de ensaio e avaliação.

IC_{50}: Pode estimar-se através da determinação da concentração à qual um produto químico de referência reduz a viabilidade dos tecidos em 50 % (IC_{50}) após um tempo de exposição fixo, ver também ET_{50}.

Mistura: Mistura ou solução constituída por duas ou mais substâncias que nela não reagem.

MTT: Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio, azul de tiazolilo.

NC: Não corrosivo.

Normas de desempenho: Normas associadas a um método de ensaio validado com base nas quais pode ser avaliada a comparabilidade de um método de ensaio proposto que lhe seja funcional e mecanisticamente similar. Incluem: (i) componentes essenciais do método de ensaio; (ii) uma lista mínima de produtos químicos de referência, escolhidos de entre os produtos químicos utilizados para demonstrar o desempenho aceitável do método de ensaio validado; e (iii) níveis de fiabilidade e exatidão semelhantes, baseados no que foi obtido para o método de ensaio validado, que o método de ensaio proposto deve demonstrar quando avaliado pela utilização da lista mínima de produtos químicos de referência (25).

NSMTT: Redução não específica do MTT.

Produto químico: Uma substância ou mistura.

Produto químico em estudo: qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado o presente método de ensaio.

Sensibilidade: Proporção dos produtos químicos positivos/ativos que são corretamente classificados pelo método de ensaio. Constitui uma medida da exatidão de um método de ensaio cujos resultados sejam estabelecidos em função de categorias e é um aspeto importante a ter em conta na avaliação da adequação do método de ensaio (25).

Série de ensaios: Uma série de ensaios consiste no ensaio de um ou mais produtos químicos em estudo em simultâneo com um controlo negativo e um controlo positivo.

▼**M8**

Substância: um elemento químico e os seus compostos no estado natural ou obtido por qualquer processo de produção, incluindo qualquer aditivo necessário para preservar a sua estabilidade e qualquer impureza derivada do processo utilizado, mas excluindo qualquer solvente que possa ser separado sem afetar a estabilidade da substância nem modificar a sua composição.

Substância monocomponente: Substância, definida pela sua composição quantitativa, da qual um dos principais componentes está presente num teor de, pelo menos, 80 % (m/m).

Substância multicomponentes: Substância, definida pela sua composição quantitativa, da qual mais de um dos principais componentes está presente numa concentração > 10 % (m/m) e < 80 % (m/m). As substâncias multicomponentes resultam de processos de fabrico. A diferença entre uma mistura e uma substância multicomponentes reside em que a primeira se obtém misturando duas ou mais substâncias, sem reação química. As substâncias multicomponentes resultam de reações químicas.

UPLC: Cromatografia líquida de muito alta resolução.

UVCB: Substâncias de composição desconhecida ou variável, produtos de reação complexos ou materiais biológicos.

Viabilidade celular: Parâmetro que mede a atividade total de uma população celular (por exemplo, em termos de capacidade das desidrogenases mitocondriais celulares para reduzirem o corante MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio, azul de tiazolilo]; consoante o indicador determinado e o tipo de ensaio realizado, é possível correlacionar a viabilidade celular com o número total de células vivas e/ou a vitalidade dessas células.

▼M8

Apêndice 2

PRINCIPAIS COMPONENTES DOS MODELOS DE ENSAIO RHE VALIDADOS PARA ENSAIOS DE CORROSÃO

Componentes do modelo de ensaio	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Superfície do modelo	0,38 cm^2	0,63 cm^2	0,5 cm^2	0,6 cm^2
Número de tecidos replicados	Pelo menos 2 por período de exposição	2-3 por período de exposição	Pelo menos 2 por período de exposição	Pelo menos 2 por período de exposição
Doses e aplicação do tratamento	Líquidos e viscosos: 50 µl ± 3 µl (131,6 µl/cm^2) Sólidos: 20 ± 2 mg (52,6 mg/cm^2) + 100 µl ± 5µl de solução de NaCl (9 g/l) Cerosos/aderentes: 50 ± 2 mg (131,6 mg/cm^2) com uma malha de *nylon*	Líquidos: 50 µl (79,4 µl/cm^2), com ou sem malha de *nylon* *Compatibilidade do produto químico com a malha de* nylon *antes do ensaio* Semissólidos: 50 µl (79,4 µl/cm^2) Sólidos: 25 µl H_2O (ou mais, se necessário) + 25 mg (39,7 mg/cm^2) Ceras: peça achatada em forma de disco com cerca de 8 mm de diâmetro colocada sobre o tecido humedecido com 15 µl H_2O.	Líquidos e viscosos: 40 µl ± 3µl (80 µl/cm^2) com malha de *nylon* *Compatibilidade do produto químico com a malha de* nylon *antes do ensaio* Sólidos: 20 µl ±2µl H_2O + 20 ± 3 mg (40 mg/cm^2) Cerosos/aderentes: 203 mg (40 mg/cm 2) com malha de *nylon*	Líquidos: 50 µl (83,3 µl/cm^2) com malha de nylon *Compatibilidade do produto químico com a malha de* nylon *antes do ensaio* Semissólidos: 50 µl (83,3 µl/cm^2) Sólidos: 25 mg (41,7 mg/cm^2) + 25 µl H_2O (ou mais, se necessário) Cerosos: peça achatada em forma de bolacha com cerca de 8 mm de diâmetro colocada sobre o tecido humedecido com 15 µl H_2O.
Controlo prévio para redução direta do MTT	50 µl (líquido) ou 20 mg (sólido) +2 ml de MTT Solução de 0,3 mg/ml por 180 ± 5 min a 37°C, 5 % CO_2, 95 % HR → se a solução ficar azul/púrpura, devem ser efetuados controlos adaptados à água	50 µl (líquido) ou 25 mg (sólido)1 ml de MTT Solução de 1 mg/ml por 60 min a 37°C, 5 % CO_2, 95 % HR → se a solução ficar azul/púrpura, devem ser efetuados controlos adaptados.	40 µl (líquido) ou 20 mg (sólido)1 ml de MTT Solução de 1 mg/ml 180 ± 15 min a 37 °C, 5 % de CO_2, 95 % RH → se a solução ficar azul/púrpura, devem ser efetuados controlos adaptados.	50 µl (líquido) ou 25 mg (sólido)1 ml de MTT Solução de 1 mg/ml por 60 min a 37°C, 5 % CO_2, 95 % HR → se a solução ficar azul/púrpura, devem ser efetuados controlos adaptados.

▼M8

Componentes do modelo de ensaio	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Controlo prévio para interferência de cor	10 µl (líquido) ou 10 mg (sólido) + 90 µl H_2O misturados durante 15 minutos à temperatura ambiente → se a solução adquirir cor, devem ser efetuados controlos vivos adaptados	50 µl (líquido) ou 25 mg (sólido) +300 µl H_2O durante 60 minutos a 37 °C, 5 % de CO_2, 95 % HR → se a solução adquirir cor, devem ser efetuados controlos vivos adaptados	40 µl (líquido) ou 20 mg (sólido) +300 µl H_2O misturados durante 60 minutos à temperatura ambiente → se o produto químico em estudo for corado, devem ser efetuados controlos adaptados ao nível de vida	50 µl (líquido) ou 25 mg (sólido) +300 µl H_2O durante 60 minutos a 37 °C, 5 % de CO_2, 95 % HR →Se a solução adquirir cor, devem ser efetuados controlos vivos adaptados
Tempo e temperatura de exposição	3 min, 60 min (±5 min) e 240 min (±10 min) Câmara ventilada Temperatura ambiente (TA, 18-28 °C)	3 minutos à temperatura ambiente e nos 60 min a 37°C, 5 % CO_2, 95 % HR	3 minutos à temperatura ambiente e nos 60 min a 37°C, 5 % CO_2, 95 % HR	3 minutos à temperatura ambiente e nos 60 min a 37°C, 5 % CO_2, 95 % HR
Enxaguamento	25 ml 1x PBS (2 ml/lançamento)	20 vezes com um fluxo suave e constante de 1x PBS	20 vezes com um fluxo suave e constante de 1x PBS	20 vezes com um fluxo suave e constante de 1x PBS
Amostra de controlo negativo	50 µl de solução de NaCl (9 g/l) Testados com cada tempo de exposição	50 µl H_2O Testados com cada tempo de exposição	40 µl H_2O Testados com cada tempo de exposição	50 µl H_2O Testados com cada tempo de exposição
Amostra de controlo positivo	50 µl de ácido acético glacial Testado apenas durante 4 horas	50 µl de KOH 8 N Testado com cada tempo de exposição	40 µl de KOH 8 N Testado apenas durante 1 hora	50 µl de KOH 8 N Testado com cada tempo de exposição
Solução de MTT	2 ml 0,3 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml
Tempo de incubação e temperatura do MTT	180 min (± 15 min) a 37 °C, 5 % CO_2, 95 % HR	180 min a 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH	180 min (±15 min) a 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH	180 min a 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH

▼M8

Componentes do modelo de ensaio	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Solvente de extração	500 µl de isopropanol acidificado (0,04 N HCl em isopropanol) (tecidos isolados totalmente imersos)	2 ml de isopropanol (extração da superfície e do fundo da inserção)	1,5 ml de isopropanol (extração da superfície e do fundo da inserção)	2 ml de isopropanol (extração da superfície e do fundo da inserção)
Tempo e temperatura de extração	De um dia para o outro, à temperatura ambiente, protegido da luz	De um dia para o outro, sem agitar, à temperatura ambiente, ou, agitando, (~ 120 rpm), à temperatura ambiente	De um dia para o outro, sem agitar, à temperatura ambiente, ou, agitando, (~ 120 rpm), à temperatura ambiente	De um dia para o outro, sem agitar, à temperatura ambiente, ou, agitando, (~ 120 rpm), à temperatura ambiente
Leitura da densidade ótica	570 nm (545-595 nm) sem filtro de referência	570 nm (ou 540 nm) sem filtro de referência	570 nm (540-600 nm) sem filtro de referência	540-570 nm sem filtro de referência
Controlo da qualidade dos tecidos	18 horas de tratamento com SDS 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,0 mg/ml	Tratamento com 1 % Triton X-100 4,08 horas ≤ ET_{50} ≤ 8,7 horas	Tratamento com 1 % Triton X-100 4,0 horas ≤ ET_{50} ≤ 10,0 horas	Tratamento com 1 % Triton X-100 2,0 horas ≤ ET_{50} ≤ 7,0 horas
Critérios de aceitabilidade	1. A densidade ótica média dos replicados tratados com o controlo negativo (NaCl) deve ser ≥ 0,6 e ≤ 1,5 para todos os tempos de exposição. 2. A viabilidade média dos tecidos replicados expostos durante 4 horas com controlo positivo (ácido acético glacial), expressa em % do controlo negativo, deve ser ≤ 20 % 3. No intervalo de viabilidade de 20--100 % e para densidades óticas ≥ 0,3, a diferença de viabilidade entre os dois tecidos replicados não deve exceder 30 %.	1. A densidade ótica média dos replicados tratados com o controlo negativo (H_2O) deve ser ≥ 0,8 e ≤ 2,8 para todos os tempos de exposição. 2. A viabilidade média dos tecidos replicados expostos durante 1 hora com controlo positivo (KOH 8 N), expressa em % do controlo negativo, deve ser < 15 %. 3. No intervalo de viabilidade de 20--100 %, o coeficiente de variação (CV) entre os tecidos replicados deve ser ≤ 30 %.	1. A densidade ótica média dos replicados tratados com o controlo negativo (H_2O) deve ser ≥ 0,8 e ≤ 3,0 para todos os tempos de exposição. 2. A viabilidade média dos tecidos replicados expostos durante 1 hora (e 4 horas, se aplicável) com controlo positivo (KOH 8 N), expressa em % do controlo negativo, deve ser < 15 %. 3. No intervalo de viabilidade de 20--100 % e para densidades óticas ≥ 0,3, a diferença de viabilidade entre os dois tecidos replicados não deve exceder 30 %	1. A densidade ótica média dos replicados tratados com o controlo negativo (H_2O) deve ser ≥ 0,8 e ≤ 2,8 para todos os tempos de exposição. 2. A viabilidade média dos tecidos replicados expostos durante 1 hora com controlo positivo (KOH 8 N), expressa em % do controlo negativo, deve < 20 %. 3. No intervalo de viabilidade de 20--100 % e para densidades óticas ≥ 0,3, a diferença de viabilidade entre os dois tecidos replicados não deve exceder 30 %

▼M8

Apêndice 3

DESEMPENHO DOS MODELOS DE ENSAIO PARA SUBCATEGORIZAÇÃO

O quadro seguinte apresenta os desempenhos dos quatro modelos de ensaio, calculados a partir de um conjunto de 80 produtos químicos testados pelos quatro concetores dos ensaios. Os cálculos foram efetuados pelo Secretariado da OCDE, analisados e aprovados por um subgrupo de peritos (21) (23).

Os modelos de ensaio EpiSkin™, EpiDerm™, SkinEthic™ and epiCS® permitem classificar em subcategorias (ou seja, 1A *versus* 1B e 1C *versus* NC)

Desempenhos, taxas de sobreclassificação, taxas de subclassificação e exatidão (capacidade de previsão) dos quatro modelos de ensaio, a partir de um conjunto de 80 produtos químicos, todos testados em mais de 2 ou 3 séries de ensaios com cada modelo de ensaio:

ESTATÍSTICAS SOBRE AS PREVISÕES OBTIDAS RELATIVAMENTE AO CONJUNTO DE PRODUTOS QUÍMICOS

(n = 80 produtos químicos testados em 2 séries de ensaios independentes com epiderme humana reconstruída epiCS ® ou 3 ensaios independentes com epiderme humana reconstruída EpiDerm™ SCT, EpiSkin™ and SkinEthic™, ou seja, respetivamente 159 (*) ou 240 classificações)

	EpiSkin™	EpiDerm™	SkinEthic™	epiCS®
Sobreclassificações:				
1B e 1C mais sobreclassificados do que 1A	21,50 %	29,0 %	31,2 %	32,8 %
NC mais sobreclassificado do que 1B e 1C	20,7 %	23,4 %	27,0 %	28,4 %
NC mais sobreclassificado do que 1A	0,00 %	2,7 %	0,0 %	0,00 %
Corrosivo sobreclassificado	20,7 %	26,1 %	27,0 %	28,4 %
Taxa global de sobreclassificação (todas as categorias)	**17,9 %**	**23,3 %**	**24,5 %**	**25,8 %**
Subclassificações:				
1A menos sobreclassificado do que 1B e 1C	16,7 %	16,7 %	16,7 %	12,5 %
1A menos sobreclassificado do que NC	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
1B e 1C menos sobreclassificado do que NC	2,2 %	0,00 %	7,5 %	6,6 %
Taxa global de subclassificação (todas as categorias)	**3,3 %**	**2,5 %**	**5,4 %**	**4,4 %**
Classificações corretas:				
1A corretamente classificada	83,3 %	83,3 %	83,3 %	87,5 %
1B e 1C corretamente classificadas	76,3 %	71,0 %	61,3 %	60,7 %
NC corretamente classificado	79,3 %	73,9 %	73,0 %	71,62 %
Exatidão global	**78,8 %**	**74,2 %**	**70 %**	**69,8 %**

NC: Não corrosivo

(*) um produto químico foi testado uma vez em epiCS® devido à ausência de disponibilidade (23)

▼**M8**

Apêndice 4

Parâmetros fundamentais e critérios de aceitação para a qualificação de um sistema de HPLC/UPLC–espetrofotometria para a medição de formazano extraído de epiderme humana reconstruída

Parâmetro	Protocolo derivado do documento de orientação da FDA (37) (38)	Critérios de aceitação
Seletividade	Análise do isopropanol, branco vivo (extração de isopropanol de tecidos vivos de epiderme humana reconstruída sem qualquer tratamento), branco morto (extração de isopropanol de tecidos mortos de epiderme humana reconstruída sem qualquer tratamento)	$Area_{interferência} \leq 20$ % of $Area_{LLOQ}$ (1)
Precisão	Controlos de qualidade (MTT formazano a 1,6 µg/ml, 16 µg/ml e 160 µg/ml) em isopropanol (n = 5)	CV ≤ 15 % ou ≤ 20 % para o LLOQ
Exatidão	Controlos de qualidade em isopropanol (n = 5)	% Dev ≤ 15 % ou ≤ 20 % para LLOQ
Efeito matriz	Controlos de qualidade em branco vivo (n = 5)	85 % ≤ Efeitos Matriz % ≤ 115 %
Passagem	Análise de isopropanol após um padrão ULOQ[2] (2)	$Area_{interferência} \leq 20$ % of $Area_{LLOQ}$
Reprodutibilidade (intradiária)	3 curvas de calibração independentes (com base em 6 diluições consecutivas de 1/3 de MTT formazano em isopropanol, com início em ULOQ, isto é, 200 µg/ml); Controlos de qualidade em isopropanol (n = 5)	Curvas de calibração: % Dev ≤ 15 % ou ≤ 20 % para LLOQ Controlos de qualidade: % Dev ≤ 15 % e CV ≤ 15 %
Reprodutibilidade (intradiária)	Dia 1: 1 curva de calibração e controlos de qualidade no isopropanol (n = 3) Dia 2: 1 curva de calibração e controlos de qualidade no isopropanol (n = 3) Dia 3: 1 curva de calibração e controlos de qualidade no isopropanol (n = 3)	
Estabilidade a curto prazo do MTT formazano em extratos de tecidos de epiderme humana reconstruída	Controlos de qualidade em branco vivo (n = 3), análise no dia da preparação e após 24 horas de armazenagem à temperatura ambiente.	% Dev ≤ 15 %
Estabilidade a longo prazo do MTT formazano em extratos de tecidos de epiderme humana reconstruída, se necessário	Controlos de qualidade em branco vivo (n = 3), análise no dia da preparação e após vários dias de armazenagem a uma temperatura especificada (p. ex., 4 °C, — 20 °C, — 80 °C)	% Dev ≤ 15 %

(1) LLOQ: Limite inferior de quantificação, definido de forma a abranger 1-2 % de viabilidade dos tecidos, ou seja, 0,8 µg/ml.
(2) ULOQ: Limite superior de quantificação, definido para ser duas vezes superior à mais elevada concentração de formatazano em extratos de isopropanol de controlos negativos, isto é, 200 µg/ml.

▼B

B.41. **ENSAIO DE FOTOTOXICIDADE *IN VITRO* 3T3 NRU**

1. **MÉTODO**

Este método é equivalente ao OECD TG 432 (2004).

1.1. INTRODUÇÃO

A fototoxicidade é definida como uma reacção tóxica a uma substância aplicada ao corpo que é desencadeada ou intensificada (quando já se manifeste a doses inferiores) pela exposição subsequente à luz, ou induzida pela irradiação da pele depois da administração sistémica da substância.

O ensaio de fototoxicidade *in vitro* 3T3 NRU é utilizado para definir o potencial fototóxico de uma substância em estudo, induzido pela substância química excitada por exposição à luz. O ensaio avalia a fototoxicidade através da redução relativa da viabilidade de células expostas à substância química na presença de luz, comparativamente à obscuridade. As substâncias que respondam a este ensaio serão provavelmente fototóxicas *in vivo*, após aplicação sistémica e difusão pela pele ou após aplicação tópica.

Têm sido referidos os efeitos fototóxicos induzidos por muitos tipos de substâncias químicas (1) (2) (3) (4). A característica comum dessas substâncias é a capacidade de absorverem energia luminosa da radiação solar. De acordo com a primeira lei da fotoquímica (lei de Grotthaus-Draper), é necessária a absorção de uma quantidade suficiente de quanta de luz para que se observe uma fotorreacção. Antes de ser ponderada a realização de ensaios biológicos é, portanto, necessário determinar, pelo método OECD TG 101, o espectro de absorção no UV/visível da substância química em estudo. Tem sido referido que, se o coeficiente de absorção/extinção molar for inferior a 10 $l.mol^{-1}$ $.cm^{-1}$, a substância química não será provavelmente fotorreactiva. Uma substância química com tais características poderá não necessitar de ser submetida ao ensaio de fototoxicidade *in vitro* 3T3 NRU ou a qualquer outro ensaio biológico para a determinação de efeitos fotoquímicos adversos (1) (5). Ver igualmente o anexo 1.

A fiabilidade e pertinência do ensaio de fototoxicidade *in vitro* 3T3 NRU foram recentemente avaliadas (6) (7) (8) (9). O ensaio de fototoxicidade *in vitro* 3T3 NRU revelou-se capaz de prever efeitos fototóxicos agudos em animais e pessoas *in vivo*. O ensaio não se destina a prever outros efeitos adversos que possam resultar da acção combinada de uma substância química e da luz — não trata, por exemplo, da fotogenotoxicidade, da fotoalergia ou da fotocarcinogenicidade —, nem permite determinar o poder fototóxico. O ensaio também não cobre mecanismos indirectos de fototoxicidade, efeitos de metabolitos das substâncias em estudo ou efeitos de misturas.

Embora, de modo geral, seja necessário recorrer a sistemas de activação metabólica em todos os ensaios *in vitro* de previsão de potenciais genotóxicos ou carcinogénicos, no domínio da fototoxicologia são ainda raros os exemplos de substâncias químicas que necessitem de transformação metabólica para agirem como fototoxina *in vivo* ou *in vitro*. Não é, portanto, considerado necessário, nem cientificamente justificado, utilizar um sistema de activação metabólica no presente ensaio.

▼B

1.2. DEFINIÇÕES

Irradiância: Intensidade da radiação ultravioleta (UV) ou da luz visível que incide numa superfície, expressa em W/m^2 ou mW/cm^2.

Dose de radiação: Quantidade (= intensidade x tempo) de radiação ultravioleta (UV) ou de luz visível que incide numa superfície, expressa em joules (= W x s) por unidade de superfície (por exemplo, J/m ou J/cm^2).

Bandas de comprimento de onda de radiação UV: As designações recomendadas pela CIE (*Commission Internationale de l'Éclairage*) são: UVA (315-400 nm), UVB (280-315 nm) e UVC (100--280 nm). Também se utilizam outras designações: a separação entre os UVB e os UVA é frequentemente situada a 320 nm, podendo as radiações UVA subdividir-se em UV-A1 e UV-A2, com a separação a cerca de 340 nm.

Viabilidade celular: Parâmetro que mede a actividade total de uma população celular (por exemplo, absorção do pigmento vital vermelho neutro pelos lisossomas celulares); consoante a variável determinada e o tipo de ensaio realizado, é possível correlacionar a viabilidade celular com o número total e/ou a vitalidade das células.

Viabilidade celular relativa: Viabilidade celular expressa em relação a amostras de controlo (negativas) constituídas pelo solvente e submetidas a todo o procedimento de ensaio (+ Irr ou - Irr), excluído o tratamento com a substância em estudo.

PIF *(photo irritation factor* — factor de fotoirritação): Factor obtido por comparação entre duas concentrações citotóxicas igualmente eficazes (CI50) da substância química em estudo, respectivamente sem (- Irr) e com (+ Irr) exposição a uma dose não citotóxica de radiação UVA/luz visível.

CI_{50}: Concentração da substância química em estudo que reduz a viabilidade celular em 50 %.

MPE (*mean photo effect* — fotoefeito médio): Parâmetro obtido por tratamento matemático das duas curvas de concentração obtidas sem (- Irr) e com (+ Irr) exposição a uma dose não citotóxica de radiação UVA/luz visível.

Fototoxicidade: Reacção tóxica aguda desencadeada pela primeira exposição da pele a determinadas substâncias químicas, seguida de exposição à luz, ou analogamente induzida por irradiação da pele depois da administração sistémica da substância.

1.3. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

O ensaio de fototoxicidade *in vitro* 3T3 NRU baseia-se na comparação da citotoxicidade de uma substância química com ou sem exposição a uma dose não citotóxica de luz solar simulada. No âmbito deste ensaio, a citotoxicidade é expressa pela redução, função da concentração, da absorção do pigmento vital vermelho neutro, medida 24 horas depois do tratamento com a substância química em estudo e da irradiação (10). O vermelho neutro (Neutral Red, NR) é um corante catiónico fraco que penetra facilmente nas membranas celulares por um mecanismo distinto da difusão, acumulando-se nos lisossomas intracelulares. As alterações da superfície da sensível membrana dos lisossomas fragilizam estes últimos e originam outras alterações, que se tornam gradualmente irreversíveis. Essas alterações resultantes da acção dos xenobióticos reduzem a absorção e ligação do vermelho neutro. Pode, portanto, estabelecer-se uma distinção entre células viáveis, danificadas ou mortas, base do presente ensaio.

▼B

Efectua-se uma cultura de células Balb/c 3T3 durante 24 h, para formação de monocamadas. Para cada substância química em estudo, procede-se à pré-incubação, durante 1 h, de duas placas de 96 alvéolos com oito concentrações diferentes da substância. A seguir, expõe-se uma das placas à mais elevada dose de irradiação não citotóxica e mantém-se a outra na obscuridade. Seguidamente, substitui-se o meio de tratamento por meio de cultura em ambas as placas; após nova incubação de 24 horas, determina-se a viabilidade celular através da absorção do vermelho neutro. A viabilidade celular é expressa em percentagem das amostras de solvente não tratadas de controlo e é calculada para cada concentração de ensaio. Para a previsão do potencial fototóxico, comparam-se as reacções, função da concentração, obtidas com e sem irradiação, em geral ao nível CI_{50} (concentração que reduz a viabilidade celular a 50 %, relativamente às amostras de controlo não tratadas).

1.4. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.4.1. **Preparações**

1.4.1.1. *Células*

No estudo de validação, foi utilizada uma linhagem celular permanente de fibroblastos de ratinho (Balb/c 3T3, clone 31) proveniente da ATCC (*American Type Culture Collection*, Manassas, VA, EUA) ou da ECACC (*European Collection of Cell Cultures*, Salisbury, Wiltshire, Reino Unido), a qual é, portanto, recomendada, devendo ser obtida de uma colecção de células adequadamente qualificada. Podem utilizar-se outras células ou linhagens celulares, aplicando o mesmo procedimento de ensaio, se as condições de cultura forem adaptadas às necessidades específicas das células em causa, embora deva, nesse caso, ser demonstrada a equivalência.

Deve comprovar-se regularmente que as células não estão contaminadas por micoplasmas, só devendo as mesmas ser utilizadas se esse tipo de microrganismo não for detectado (11).

É importante comprovar periodicamente a sensibilidade das células às radiações UV por aplicação do procedimento de controlo de qualidade descrito no presente método. Uma vez que a sensibilidade das células às radiações UVA pode aumentar com o número de repicagens, devem utilizar-se células Balb/c 3T3 que tenham sido objecto do menor número possível de repicagens (de preferência menos de 100). (Ver o ponto 1.4.2.2.2 e o anexo 2.)

1.4.1.2. *Meios e condições de cultura*

Nas repicagens celulares de rotina e na execução do ensaio, devem utilizar-se meios de cultura e condições de incubação adequados; por exemplo, no caso das células Balb/c 3T3, recomenda-se a utilização de DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), enriquecido com soro de bovino recém-nascido (10 %), glutamina (4 mM), penicilina (100 UI) e estreptomicina (100 µg/ml), e a incubação em atmosfera húmida a 37°C, com 5 % a 7,5 % de CO_2, dependendo do tampão (ver o segundo parágrafo do ponto 1.4.1.4). É particularmente importante que as condições de cultura celular permitam manter o ciclo celular dentro dos valores normais publicados das células ou linhagem celular utilizadas.

1.4.1.3. *Preparação das culturas*

Inoculam-se num meio de cultura com a densidade adequada células provenientes de culturas-mãe congeladas, efectuando-se pelo menos uma subcultura antes de as utilizar no ensaio de fototoxicidade *in vitro* 3T3 NRU.

▼B

Para o ensaio de fototoxicidade, inoculam-se as células num meio de cultura com a densidade apropriada, de modo que as culturas não confluam durante o ensaio, ou seja, até à determinação da viabilidade celular, 48 h após a inoculação das células. No caso das células Balb/c 3T3 cultivadas em placas de 96 alvéolos, recomenda-se uma densidade de inoculação de 1 x 10 células por alvéolo.

Para cada substância química em estudo, inoculam-se as células de modo idêntico em duas placas de 96 alvéolos, mantendo-se depois as condições de cultura de ambas ao longo de todo o ensaio, excepto durante o período de irradiação de uma das placas (+ Irr), durante o qual a outra é mantida na obscuridade (- Irr).

1.4.1.4. *Preparação da substância em estudo*

As substâncias em estudo devem preparar-se de fresco, imediatamente antes da utilização, excepto se se mantiverem comprovadamente estáveis na armazenagem. Recomenda-se que a manipulação da substância química e o tratamento inicial das células decorram sob condições de luz que evitem a fotoactivação ou degradação da substância em estudo antes da irradiação.

Dissolvem-se as substâncias em estudo em tampões salinos, como o EBSS (*Earle's Balanced Salt Solution*) ou outra solução-tampão fisiologicamente equilibrada, isentos de componentes proteicos e de componentes que absorvam a luz (por exemplo, corantes indicadores de pH ou vitaminas), para evitar interferências durante a irradiação. Dado que, durante a irradiação, as células são mantidas cerca de 50 minutos fora do incubador sob atmosfera de CO_2, é necessário tomar precauções para evitar a alcalinização. Se forem utilizados tampões fracos, como o EBSS, poderão, para o efeito, incubar-se as células sob uma atmosfera com 7,5 % de CO_2. Se as células forem incubadas sob uma atmosfera com apenas 5 % de CO_2, será necessário utilizar um tampão mais forte.

As substâncias químicas em estudo fracamente solúveis em água devem ser dissolvidas num solvente adequado. Caso se utilize um solvente, a sua concentração volúmica deve ser constante em todas as culturas, tanto nas amostras de controlo negativas (solvente) como a todas as concentrações da substância química em estudo, e o solvente não deve ser citotóxico àquela concentração. As concentrações da substância química em estudo devem ser escolhidas de modo a evitar precipitados ou turvações.

Recomenda-se a utilização de dimetilsulfóxido (DMSO) e de etanol como solventes. Podem utilizar-se outros solventes de baixa citotoxicidade. Antes de serem utilizados, devem, porém, avaliar-se determinadas propriedades específicas, nomeadamente a reactividade com a substância química em estudo, a atenuação do efeito fototóxico, propriedades de eliminação de radicais e/ou a estabilidade química no solvente.

Se necessário, pode recorrer-se a um agitador mecânico e/ou a ultra-sons e/ou a aquecimento a temperaturas apropriadas para facilitar a dissolução, salvo se tal afectar a estabilidade da substância química em estudo.

▼B

1.4.1.5. *Condições de irradiação*

1.4.1.5.1. Fonte luminosa

A escolha de uma fonte luminosa e de filtros adequados é crucial nos ensaios de fototoxicidade. As regiões do visível e do UVA encontram-se normalmente associadas a reacções fototóxicas *in vivo* (3) (12), ao passo que os UVB são, em geral, menos importantes a esse nível, apresentando em contrapartida elevada citotoxicidade; esta aumenta de um factor de 1 000 ao passar de um comprimento de onda de 313 nm para 280 nm (13). Os critérios de selecção de uma fonte luminosa adequada devem incluir os requisitos da emissão de comprimentos de onda que a substância química em estudo absorva (espectro de absorção) e da obtenção, num período de exposição razoável, de doses de luz suficientes para a detecção das substâncias químicas fotocitotóxicas conhecidas. Além disso, os comprimentos de onda e as doses utilizadas não devem causar danos desnecessários ao sistema em estudo, nomeadamente devido à emissão de calor (região do infravermelho).

Considera-se que a melhor fonte luminosa artificial é constituída por simuladores de luz solar. A distribuição da potência de irradiação do simulador de luz solar com filtros deve ser próxima da correspondente à luz solar ao ar livre descrita em (14). Como simuladores de luz solar são utilizados arcos de xénon e arcos de mercúrio (dopado)-halogeneto metálico (15). Estes últimos apresentam a vantagem de emitirem menos calor e de serem mais económicos, mas não reproduzem a luz solar tão bem como os arcos de xénon. Dado que todos os simuladores de luz solar emitem quantidades significativas de radiação UVB, devem utilizar-se filtros adequados para atenuar os comprimentos de onda UVB, altamente citotóxicos. Dado que o material de plástico utilizado nas culturas celulares contém estabilizadores de UV, o espectro deve ser medido através do mesmo tipo de cobertura das placas de 96 alvéolos utilizado no ensaio. Independentemente das medidas tomadas para atenuar partes do espectro com filtros e dos efeitos de filtro inevitáveis do equipamento, o espectro registado após os filtros utilizados não deve desviar-se do espectro normalizado da luz solar ao ar livre (14). As referências (8) e (16) contêm um exemplo da distribuição espectral da irradiância do simulador de luz solar com filtros utilizado no estudo de validação do ensaio de fototoxicidade *in vitro* 3T3 NRU. Ver igualmente a figura 1 do anexo 2.

1.4.1.5.2. Dosimetria

Regularmente, antes de cada ensaio de fototoxicidade, deve comprovar-se a intensidade luminosa (irradiância) com um medidor de UV de banda larga adequado. A intensidade deve ser medida através do mesmo tipo de cobertura das placas de 96 alvéolos utilizado no ensaio. O medidor de UV deve ter sido previamente calibrado para a fonte luminosa. Deve comprovar-se o desempenho do medidor de UV, recomendando-se para tal a utilização de um segundo medidor de UV de referência do mesmo tipo, calibrado do mesmo modo. O ideal seria utilizar, mais espaçadamente, um espectrorradiómetro para medir o espectro de irradiação da fonte luminosa filtrada e comprovar a calibração do medidor de UV de banda larga.

Verificou-se que uma dose de 5 J/cm^2 (medida na região UVA) não é citotóxica para as células Balb/c 3T3 e é suficientemente potente para excitar as substâncias químicas, desencadeando reacções fototóxicas (6)(17); por exemplo, para obter 5 J/cm^2 em 50 minutos, ajustou-se a irradiância a 1,7 mW/cm^2. Ver igualmente a figura 2 do anexo 2. Caso se utilize outra linhagem celular ou outra fonte luminosa, pode ser necessário regular a dose irradiante, seleccionando-a de modo a que seja suficiente para excitar as fototoxinas de referência sem danificar as células. A duração da exposição luminosa é calculada do seguinte modo:

▼B

$$t(\text{min}) = \frac{\text{dose de irradiação } (J/cm^2) \times 1000}{\text{irradiância } (mW/cm^2) \times 60} \quad (1\ J = 1\ W.s)$$

1.4.2. **Condições de ensaio**

1.4.2.1. *Concentrações da substância em estudo*

As gamas de concentração da substância química em estudo com (+ Irr) e sem (- Irr) irradiação devem ser determinadas de forma adequada, em ensaios de determinação da gama de concentrações. Pode ser útil determinar a solubilidade de início e aos 60 minutos (ou após um período correspondente ao tempo de tratamento a utilizar), pois esse parâmetro pode variar ao longo do tempo ou durante a exposição. Para evitar efeitos tóxicos induzidos por condições de cultura inadequadas ou por substâncias químicas muito ácidas ou muito alcalinas, o pH das culturas celulares com a substância química em estudo deve situar-se entre 6,5 e 7,8.

A concentração mais elevada da substância química em estudo deve situar-se na gama de condições fisiológicas de ensaio; devem, nomeadamente, ser evitadas situações de tensão osmótica ou de pH. Consoante a substância química em estudo, pode ser necessário ter em conta outras propriedades físico-químicas como factor limitante da concentração de ensaio mais elevada. No caso das substâncias relativamente insolúveis que não sejam tóxicas a concentrações até ao ponto de saturação, deve ser ensaiada a concentração máxima possível. Em geral, deve ser evitada a precipitação da substância química em estudo a qualquer concentração de ensaio. A concentração máxima de uma substância em estudo não deve exceder 1 000 μg/ml; a osmolaridade não deve exceder 10 mmolar. Deve ser utilizada uma série geométrica de diluições constituída por oito concentrações da substância em estudo, com um factor de diluição constante (ver segundo parágrafo do ponto 2.1).

Se existirem dados (obtidos num ensaio de determinação da gama de concentrações) que revelem que a substância química em estudo não é citotóxica até à concentração-limite no ensaio sem irradiação (- Irr), mas é fortemente citotóxica quando irradiada (+ Irr), a gama de concentrações a seleccionar para o ensaio com irradiação (+ Irr) pode diferir da gama de concentrações seleccionada para o ensaio sem irradiação, para satisfazer os requisitos de adequabilidade da qualidade dos dados.

1.4.2.2. *Amostras de controlo*

1.4.2.2.1. Sensibilidade celular à radiação, estabelecimento de dados de referência

A sensibilidade das células à fonte luminosa deve ser verificada regularmente (aproximadamente todas as cinco repicagens) determinando a viabilidade celular após exposição a doses crescentes de irradiação. Nessa determinação, devem ser utilizadas várias doses de irradiação, incluindo níveis substancialmente superiores aos utilizados no ensaio de fototoxicidade 3T3 NRU. Essas doses são mais facilmente quantificadas através de medições na região do ultravioleta da fonte luminosa. A densidade de inoculação das células deve ser idêntica à que será irradiada no dia seguinte no ensaio de fototoxicidade *in vitro* 3T3 NRU. A viabilidade celular é determinada no dia imediato com base na absorção do vermelho neutro. Deve ser demonstrado que a dose não citotóxica mais elevada resultante [5 J/cm^2 (UVA) no estudo de validação, por exemplo] se revelou suficiente para classificar correctamente as substâncias químicas de referência (quadro 1).

▼B

1.4.2.2.2. Sensibilidade à radiação no ensaio em curso

O ensaio satisfaz os critérios de qualidade se as amostras de controlo negativas (solvente) irradiadas revelarem uma taxa de viabilidade superior a 80 %, comparativamente à amostra de controlo negativa (solvente) não irradiada.

1.4.2.2.3. Viabilidade associada às amostras de controlo constituídas pelo solvente

A densidade óptica absoluta ($DO_{540\ NRU}$) do vermelho neutro extraído das amostras de controlo constituídas pelo solvente indica se as $1x10^4$ células inoculadas em cada alvéolo se reproduziram com um tempo de duplicação normal durante os dois dias do ensaio. Um ensaio satisfaz os critérios de aceitação se a $DO_{540\ NRU}$ média das amostras de controlo não tratadas for > 0,4 (ou seja, cerca de vinte vezes a absorvância de fundo do solvente).

1.4.2.2.4. Amostras de controlo positivas

Paralelamente a cada ensaio de fototoxicidade *in vitro* 3T3 NRU deve efectuar-se um ensaio com uma substância química fototóxica conhecida. Recomenda-se a clorpromazina (CPZ). Foram definidos os seguintes critérios de aceitação do ensaio para a utilização de clorpromazina de acordo com o protocolo normalizado do ensaio de fototoxicidade *in vitro* 3T3 NRU: CPZ irradiada (+ Irr), CI_{50} = 0,1 a 2,0 μg/ml; CPZ não irradiada (- Irr), CI_{50} = 7,0 a 90,0 μg/ml. O factor de fotoirritação (PIF) deve ser superior a 6. Os resultados obtidos para as amostras de controlo positivas devem ser acompanhados ao longo do tempo.

Em vez da clorpromazina podem utilizar-se nas amostras de controlo positivas submetidas em paralelo ao ensaio outras substâncias químicas fototóxicas adequadas à categoria química ou às características de solubilidade da substância química em estudo.

1.4.3. **Procedimento de ensaio (6) (7) (8) (16) (17)**

1.4.3.1. *Primeiro dia*

Introduzir 100 μl de meio de cultura nos alvéolos periféricos de uma placa de microtitulação com 96 alvéolos para a cultura de tecidos (brancos). Nos restantes alvéolos, introduzir 100 μl de uma suspensão celular de 1×10^5 células/ml em meio de cultura (1×10^4 células por alvéolo). Devem ser preparadas duas placas para cada série de concentrações da substância em estudo e as amostras de controlo constituídas pelo solvente e positivas.

Incubar as células durante 24 h (ver o ponto 1.4.1.2), até à formação de uma monocamada semiconfluente. Este período de incubação permite a recuperação, a aderência e o crescimento exponencial das células.

1.4.3.2. *Segundo dia*

Após a incubação, decantar o meio de cultura das células e lavar cuidadosamente com 150 μl da solução tamponada utilizada na incubação. Adicionar 100 μl de tampão, com a concentração adequada da substância química em estudo ou do solvente (amostra de controlo constituída pelo solvente). Constituir oito concentrações diferentes da substância química em estudo. Incubar as células com a substância química em estudo, na obscuridade, durante 60 minutos (ver o ponto 1.4.1.2 e o segundo parágrafo do ponto 1.4.1.4).

Das duas placas preparadas para cada série de concentrações da substância química em estudo e amostras de controlo, uma é seleccionada, em geral de forma aleatória, para a determinação da citotoxicidade (- Irr), constituindo a placa de controlo, e a outra (a placa de tratamento) para a determinação da fototoxicidade (+ Irr).

▼B

No ensaio + Irr irradiam-se as células durante 50 minutos, à temperatura ambiente, através da cobertura da placa de 96 alvéolos, com a dose mais elevada de radiação não citotóxica (ver também o anexo 2). Manter as placas não irradiadas (- Irr) na obscuridade, à temperatura ambiente, durante 50 minutos (período idêntico ao da exposição luminosa).

Decantar a solução de ensaio e lavar cuidadosamente duas vezes com 150 µl da solução tamponada utilizada na incubação, mas sem a matéria em estudo. Substituir o tampão por meio de cultura e incubar (ver o ponto 1.4.1.2) de um dia para o outro (18 h a 22 h).

1.4.3.3. *Terceiro dia*

1.4.3.3.1. Exame microscópico

Utilizando um microscópio de contraste de fase examinam-se o crescimento e a morfologia das células e a integridade da monocamada celular. Registar as alterações morfológicas das células e os efeitos ao nível do crescimento celular.

1.4.3.3.2. Ensaio de absorção do vermelho neutro

Lavar as células com 150 µl de tampão pré-aquecido. Remover a solução de lavagem batendo levemente. Adicionar 100 µl de vermelho neutro (NR, cloridrato de 3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazina, número EINECS 209-035-8, número CAS 553-24-2; C.I. 50040) com a concentração de 50 µg/ml em meio sem soro (16) e incubar conforme descrito no ponto 1.4.1.2 durante 3 horas. Depois da incubação, remover o meio com vermelho neutro e lavar as células com 150 µl de tampão. Decantar e remover o excesso de tampão por uma técnica de *blotting* ou por centrifugação.

Adicionar exactamente 150 µl de solução de dessorção do vermelho neutro (solução preparada de fresco constituída por 49 partes de água, 50 partes de etanol e uma parte de ácido acético).

Agitar cuidadosamente a placa de microtitulação num agitador próprio para esse tipo de placas, durante 10 minutos, até ao vermelho neutro ser extraído das células e formar uma solução homogénea.

Medir a densidade óptica do extracto de vermelho neutro a 540 nm num espectrofotómetro, utilizando os brancos como referência. Armazenar os resultados num ficheiro electrónico de formato adequado, para tratamento posterior.

2. RESULTADOS

2.1. QUALIDADE E QUANTIDADE DOS RESULTADOS

Os resultados do ensaio devem permitir uma análise significativa da resposta obtida às variações de concentração com e sem irradiação, bem como, se possível, da concentração da substância química em estudo que reduz a viabilidade celular a 50 % (CI_{50}). Caso se observe citotoxicidade, a gama de concentrações e o intervalo entre as concentrações devem ser fixados de modo a possibilitar a adaptação de uma curva aos dados experimentais.

No caso de resultados claramente positivos ou claramente negativos (ver o primeiro parágrafo do ponto 2.3), pode bastar o ensaio primário, apoiado num ou mais ensaios preliminares de determinação da gama de concentrações.

▼B

Os resultados duvidosos, no limite ou pouco claros devem ser esclarecidos por novos ensaios (ver também o segundo parágrafo do ponto 2.4). Nesses casos, deve ser ponderada a modificação das condições experimentais. Entre as condições experimentais susceptíveis de ser modificadas contam-se a gama de concentrações ou o intervalo entre concentrações, o tempo de pré-incubação e o tempo de exposição à irradiação. No caso das substâncias químicas instáveis na água, pode ser adequado um tempo de exposição mais curto.

2.2. AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS

Para possibilitar a avaliação dos resultados, pode ser calculado um factor de fotoirritação (PIF) ou um fotoefeito médio (MPE).

Para que os cálculos baseados nas medições de fototoxicidade possam ser efectuados (ver abaixo), o conjunto das respostas individuais obtidas em função da concentração deve ser traduzido por uma curva (modelo) contínua de concentrações apropriada. O ajustamento da curva aos resultados é normalmente efectuado por um método de regressão não linear (18). Para avaliar a influência da variabilidade dos resultados na curva ajustada recomenda-se uma técnica de *bootstrap*.

O cálculo do factor de fotoirritação (PIF) é efectuado do seguinte modo:

$$\mathrm{PIF} = \frac{\mathrm{CI}_{50}(-\mathrm{Irr})}{\mathrm{CI}_{50}(+\mathrm{Irr})}$$

Se não for possível calcular a CI_{50} com irradiação ou a CI_{50} sem irradiação, não se poderá determinar o factor de fotoirritação (PIF) para a matéria em estudo. O fotoefeito médio (MPE) baseia-se na comparação das curvas de concentração completas (19). É definido como a média ponderada de um conjunto representativo de valores de fotoefeito:

$$\mathrm{MPE} = \frac{\sum_{i=1}^{n} w_i \mathrm{PE}_{c_i}}{\sum_{i=1}^{n} w_i}$$

O fotoefeito PE_C à concentração C é definido como o produto do efeito de resposta RE_C pelo efeito de dose DE_C, ou seja: $PE_C = RE_C \times DE_C$. O efeito de resposta RE_C é a diferença entre as respostas observadas com e sem irradiação, isto é: $RE_C = R_c$ (- Irr) — R_c (+ Irr). O efeito de dose é calculado do seguinte modo:

$$\mathrm{DE}_c = \left| \frac{C/C^* - 1}{C/C^* + 1} \right|$$

em que C* representa a concentração de equivalência, ou seja, a concentração à qual a resposta + Irr é igual à resposta - Irr à concentração C. Se não for possível determinar C* por os valores de resposta da curva + Irr serem sistematicamente superiores ou inferiores à curva de resposta - Irr, o efeito de dose será fixado no valor «1». Os factores de ponderação w_i são dados pelo valor de resposta mais elevado, ou seja: $w_i = \mathrm{MAX}\ \{R_i\ (+\ \mathrm{Irr}), R_i\ (-\ \mathrm{Irr})\}$. Os valores C_i de concentração são escolhidos de modo que cada intervalo de concentração definido pelos valores de concentração utilizados no ensaio contenha o mesmo número de pontos. O cálculo do MPE está limitado ao valor máximo de concentração ao qual pelo menos uma das duas curvas exiba ainda um valor de resposta mínimo de 10 %. Se essa concentração máxima exceder a concentração máxima utilizada no ensaio + Irr, a parte residual da curva + Irr será convertida no valor de resposta «0». Consoante o valor de MPE for maior ou menor do que um valor-limite de diferenciação convenientemente escolhido ($MPE_C = 0{,}15$), assim a substância química será ou não classificada de fototóxica.

▼B

Em (20) está disponível um programa para o cálculo do PIF e do MPE.

2.3. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Com base nas previsões do estudo de validação (8), se o PIF for inferior a 2 ou o MPE menor do que 0,1 a substância em estudo será não fototóxica. Se o PIF for superior a 2 e inferior a 5 ou o MPE maior do que 0,1 e menor do que 0,15, a substância em estudo será provavelmente fototóxica. Se o PIF for superior a 5 ou o MPE maior do que 0,15, a substância será fototóxica.

Os laboratórios que comecem a utilizar o presente método de ensaio devem ensaiar as matérias de referência constantes do quadro 1 antes de submeterem outras substâncias a determinações de fototoxicidade. Os valores de PIF e MPE devem ser próximos dos indicados no quadro 1.

Quadro 1

Denominação química	Número EINECS	Número CAS	PIF	MPE	Pico de absorção	Solvente [1]
Amiodarona HC1	243-293-2	[19774-82-4]	> 3,25	0,27 - 0,54	242 nm 300 nm (ombro)	Etanol
Cloropromazina HC1	200-701-3	[69-09-0]	> 14,4	0,33 - 0,63	309 nm	Etanol
Norfloxacina	274-614-4	[70458-96-7]	> 71,6	0,34 - 0,90	316 nm	Acetonitrilo
Antraceno	204-371-1	[120-12-7]	> 18,5	0,19 - 0,81	356 nm	Acetonitrilo
Protoporfirina IX, dissódio	256-815-9	[50865-01-5]	> 45,3	0,54 - 0,74	402 nm	Etanol
L-Histidina		[7006-35-1]	Não determinável	0,05 - 0,10	211nm	Água
Hexaclorofeno	200-733-8	[70-30-4]	1,1 - 1,7	0,00 - 0,05	299 nm 317nm (ombro)	Etanol
Laurilsulfato de sódio	205-788-1	[151-21-3]	1,0 - 1,9	0,00 - 0,05	Não se verifica absorção	Água

[1] Solvente utilizado nas medições de absorção.

2.4. INTERPRETAÇÃO DE DADOS

Se os efeitos fototóxicos só forem observados para a concentração de ensaio mais elevada (sobretudo no caso das substâncias químicas hidrossolúveis), poderá ser necessário ponderar outros factores na avaliação dos perigos da substância. Pode ser o caso de dados de absorção ou acumulação cutâneas da substância química e/ou de outros ensaios, por exemplo do ensaio *in vitro* da substância química em pele humana ou de animal ou em modelos cutâneos.

▼B

Se não for demonstrada a existência de toxicidade (+ Irr e - Irr) e se uma baixa solubilidade limitar as concentrações susceptíveis de serem ensaiadas, poderá ser posta em causa a compatibilidade da substância em estudo com o ensaio e deverá ser ponderada a realização de ensaios de confirmação, por exemplo com base noutro modelo.

3. **RELATÓRIOS**

RELATÓRIO DO ENSAIO

O relatório do ensaio deve incluir, pelo menos, as seguintes informações:

Substância em estudo:

— Dados identificativos, denominações genéricas comuns e números IUPAC e CAS, se forem conhecidos;

— Natureza física e grau de pureza;

— Propriedades físico-químicas relevantes para o estudo;

— Espectro de absorção no visível/UV;

— Estabilidade e fotoestabilidade, se forem conhecidas.

Solvente:

— Justificação da escolha do solvente;

— Solubilidade da substância em estudo no solvente;

— Percentagem de solvente no meio de tratamento.

Células:

— Tipo e origem das células;

— Ausência de micoplasmas;

— Número de repicagens celulares, se for conhecido;

— Sensibilidade celular à radiação, determinada com o equipamento de irradiação utilizado no ensaio de fototoxicidade *in vitro* 3T3 NRU.

Condições de ensaio — 1) *Incubação antes e depois do tratamento:*

— Tipo e composição do meio de cultura;

— Condições de incubação (concentração de CO_2, temperatura e humidade);

— Duração da incubação (antes e depois do tratamento).

Condições de ensaio — 2) *Tratamento com a substância química:*

— Fundamentação da escolha das concentrações da substância química em estudo utilizadas nos ensaios com e sem irradiação;

— Caso a substância química em estudo seja fracamente solúvel e não citotóxica, fundamentação da escolha da maior concentração ensaiada;

— Tipo e composição do meio de tratamento (tampão salino);

— Duração do tratamento químico.

Condições de ensaio — 3) *Irradiação:*

— Fundamentação da escolha da fonte luminosa utilizada;

▼B

— Fabricante e tipo da fonte luminosa e do radiómetro;

— Características de irradiância espectral da fonte luminosa;

— Características de transmissão e absorção do filtro ou filtros utilizados;

— Características do radiómetro e condições de calibração do mesmo;

— Distância entre a fonte luminosa e o sistema de ensaio;

— Irradiância UVA a essa distância, expressa em mW/cm^2;

— Duração da exposição à radiação UV/luz visível;

— Dose de radiação UVA (irradiância x tempo), expressa em J/cm^2;

— Temperatura das culturas celulares durante a irradiação e das culturas celulares mantidas paralelamente na obscuridade.

Condições de ensaio — 4) *Ensaio de viabilidade com o vermelho neutro:*

— Composição do meio de tratamento com vermelho neutro;

— Duração da incubação com vermelho neutro;

— Condições de incubação (concentração de CO_2, temperatura e humidade);

— Condições de extracção do vermelho neutro (agente de extracção, duração);

— Comprimento de onda utilizado na leitura espectrofotométrica da densidade óptica do vermelho neutro;

— Segundo comprimento de onda (referência), se for utilizado;

— Composição do branco eventualmente utilizado no espectrofotómetro.

Resultados:

— Viabilidade celular obtida para cada concentração da substância química em estudo, expressa em percentagem da viabilidade média das amostras de controlo paralelas;

— Curvas de concentração (viabilidade celular relativa em função da concentração da substância química em estudo) obtidas nos ensaios + Irr e - Irr paralelos;

— Análise das curvas de concentração: se possível, cálculo automático/cálculo manual de CI_{50} (+ Irr) e de CI_{50} (- Irr);

— Comparação das duas curvas de concentração obtidas com e sem irradiação, por cálculo do factor de fotoirritação (PIF) ou do fotoefeito médio (MPE);

— Critérios de aceitação do ensaio — amostra de controlo constituída pelo solvente paralela;

— Viabilidade absoluta (densidade óptica do extracto de vermelho neutro) das células irradiadas e não irradiadas;

— Dados de referência das amostras de controlo negativas (solvente); médias e desvios-padrão;

— Critérios de aceitação do ensaio — amostra de controlo positiva paralela;

▼B

— CI_{50} (+ Irr) e CI_{50} (- Irr) e PIF/MPE da substância química da amostra de controlo positiva;

— Dados de referência da substância química da amostra de controlo positiva: CI_{50} (+ Irr) e CI_{50} (- Irr) e PIF/MPE; médias e desvios-padrão.

Discussão dos resultados.

Conclusões.

4. **REFERÊNCIAS**

(1) Lovell W.W., (1993) A scheme for *in vitro* screening of substances for photoallergenic potential. Toxicology *In Vitro* 7, p. 95-102.

(2) Santamaria, L. and Prino, G., (1972) List of the photodynamic substances. In «Research Progress in Organic, Biological and Medicinal Chemistry» Vol. 3 part 1. North Holland Publishing Co. Amsterdam. p. XI-V.

(3) Spielmann, H., Lovell, W.W., Hölzle, E., Johnson, B.E., Maurer, T., Miranda, M.A., Pape, W.J.W., Sapora, O., and Sladowski, D., (1994) *In vitro* phototoxicity testing: The report and recommendations of ECVAM Workshop 2. ATLA, 22, p. 314-348.

(4) Spikes, J.D., (1989) Photosensitisation. In «The science of Photobiology» Edited by K.C. Smith. Plenum Press, New York. 2nd edition, p. 79-110.

(5) OECD (1997) Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No 7 «Guidance Document On Direct Phototransformation Of Chemicals In Water» Environment Directorate, OECD, Paris.

(6) Spielmann, H., Balls, M., Döring, B., Holzhütter, H.G., Kalweit, S., Klecak, G., L'Eplattenier, H., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Moldenhauer. F. Moore. L., Pape, W., Pfannbecker, U., Potthast, J., De Silva, O., Steiling, W., and Willshaw, A., (1994) EEC/COLIPA project on *in vitro* phototoxicity testing: First results obtained with a Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay. Toxicology *In Vitro* 8, p. 793-796.

(7) Anon (1998) Statement on the scientific validity of the 3T3 NRU PT test (an *in vitro* test for phototoxicity), European Commission, Joint Research Centre: ECVAM and DGXI/E/2, 3 November 1997, ATLA, 26, p. 7-8.

(8) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., Pechovitch, G. De Silva, O., Holzhütter, H.G., Clothier, R., Desolle, P., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Pfannenbecker, U., Potthast, J. M., Csato, M., Sladowski, D., Steiling, W., and Brantom, P., (1998) The international EU/COLIPA *In vitro* phototoxicity validation study: results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test. Toxicology *In Vitro* 12, p. 305-327.

(9) OECD (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The *In Vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test Guideline Proposal, Berlin, 30th-31th October 2001, Secretariat's Final Summary Report, 15th March 2002, OECD ENV/EHS, available upon request from the Secretariat.

(10) Borenfreund, E., and Puerner, J.A., (1985) Toxicity determination *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. Toxicology Lett. 24, p. 119-124.

(11) Hay, R.J., (1988) The seed stock concept and quality control for cell lines. Analytical Biochemistry 171, p. 225-237.

▼B

(12) Lambert L.A, Warner W.G., and Kornhauser A., (1996) Animal models for phototoxicity testing. In «Dermatotoxicology», edited by F.N. Marzulli and H.I. Maibach. Taylor & Francis, Washington DC. 5th Edition, p. 515-530.

(13) Tyrrell R.M., Pidoux M (1987) Action spectra for human skin cells: estimates of the relative cytotoxicity of the middle ultraviolet, near ultraviolet and violet regions of sunlight on epidermal keratinocytes. Cancer Res., 47, p. 1825-1829.

(14) ISO 10977., (1993) Photography — Processed photographic colour films and paper prints — Methods for measuring image stability.

(15) Sunscreen Testing (UV.B) TECHNICALREPORT, CIE, International Commission on Illumnation, Publication No 90, Vienna, 1993, ISBN 3 900 734 275

(16) ZEBET/ECVAM/COLIPA — Standard Operating Procedure: *In Vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test. Final Version, 7 September, 1998 (18 páginas).

(17) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., De Silva, O., Holzhütter, H.G., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., and Pfannenbecker, U., (1998) A study on UV filter chemicals from Annex VII of the European Union *Directive 76/768/EEC,* in the *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity test. ATLA 26, p. 679-708.

(18) Holzhütter, H.G., and Quedenau, J., (1995) Mathematical modeling of cellular responses to external signals. J. Biol. Systems 3, p. 127-138.

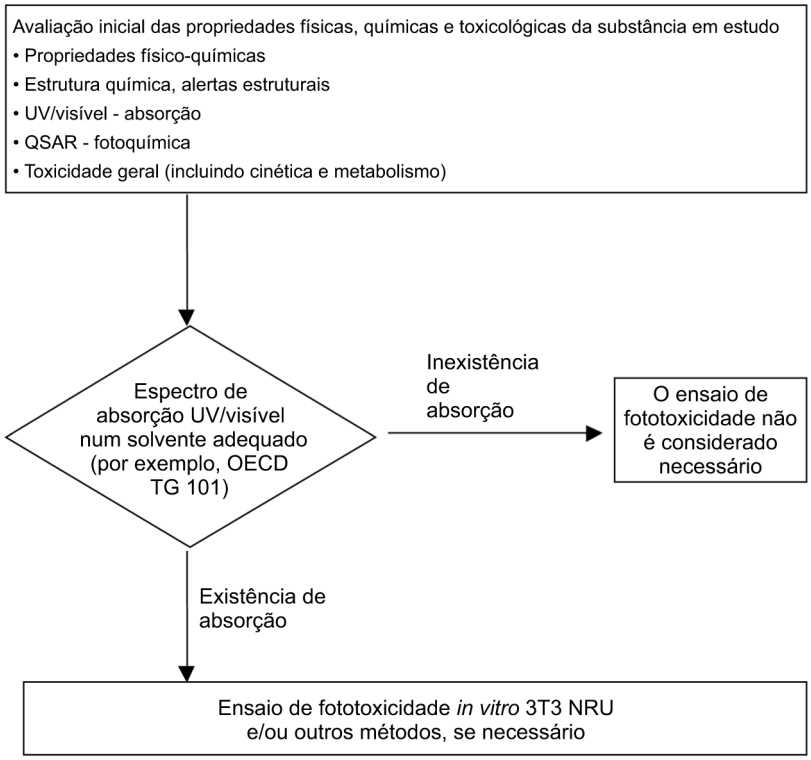
(19) Holzhütter, H.G., (1997) A general measure of *in vitro* phototoxicity derived from pairs of dose-response curves and its use for predicting the *in vivo* phototoxicity of chemicals. ATLA, 25, p. 445-462.

(20) http://www.oecd.org/document/55/0,2340,en_2649_34377_2349687_1_1_1_1,00.html

▼B

ANEXO 1

Papel do ensaio de fitotoxicidade 3T3 NRU numa abordagem sequencial da determinação da fitotoxicidade de substâncias químicas

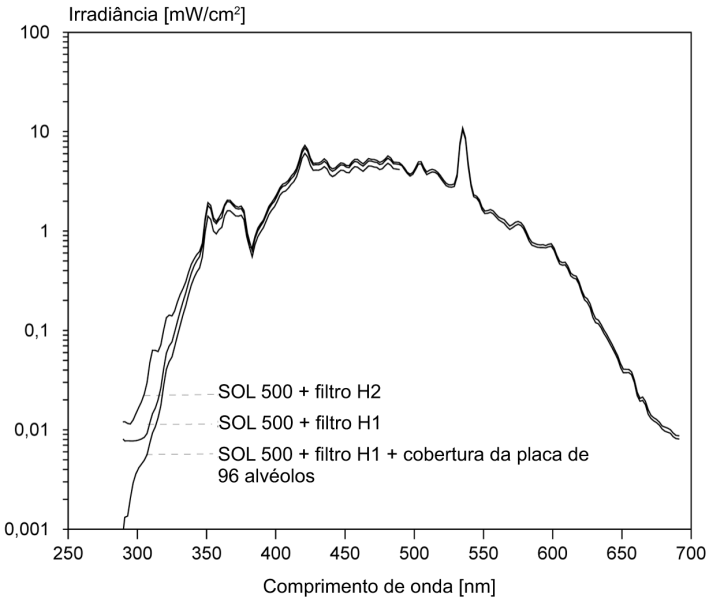


▼B

ANEXO 2

Figura 1

Distribuição espectral da potência de um simulador de luz solar com filtros



(Ver segundo parágrafo do ponto 1.4.1.5.)

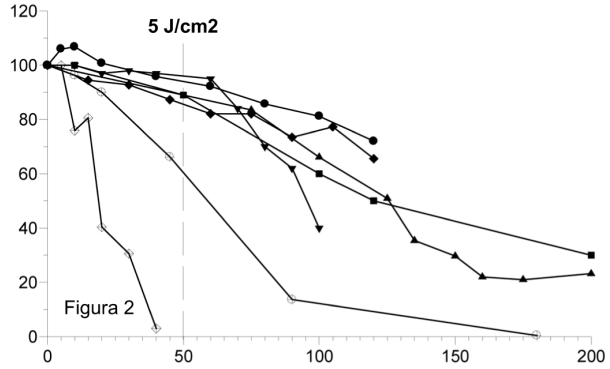
A figura 1 apresenta um exemplo de uma distribuição espectral de irradiância aceitável de um simulador de luz solar com filtros, proveniente da fonte de halogeneto metálico dopada utilizada no estudo de validação do ensaio de foto-toxicidade 3T3 NRU (6)(8)(17). Mostra-se o efeito de dois filtros diferentes e o efeito filtrante suplementar da cobertura da placa de cultura celular com 96 alvéolos. O filtro H2 só foi utilizado com sistemas de ensaio que toleram doses mais elevadas de UVB (ensaio em modelo cutâneo e ensaio da foto-hemólise de glóbulos vermelhos). No ensaio de fototoxicidade 3T3 NRU foi utilizado o filtro H1. A figura mostra que o efeito filtrante adicional da cobertura da placa é sobretudo observado nos UVB e que o espectro de irradiação continua a ter radiação UVB suficiente para excitar as substâncias químicas que absorvem sobretudo nessa região espectral, como a Amiodarona (ver quadro 1).

▼B

Figura 2

Sensibilidade das células Balb/c 3T3 à irradiação (medida nos UVA)

Viabilidade celular (percentagem de absorção do vermelho neutro em relação às amostras de controlo mantidas na obscuridade)



Tempo de irradiação (minutos)

(10 min = 1 joule UVA/cm²)

(Ver segundo parágrafo do ponto 1.4.1.5.2 e os pontos 1.4.2.2.1 e 1.4.2.2.2.)

Sensibilidade das células Balb/c 3T3 à irradiação com o simulador de luz solar utilizado no estudo de validação do ensaio de fototoxicidade 3T3 NRU, medida nos UVA. A figura mostra os resultados obtidos no estudo de pré-validação em sete laboratórios distintos (1). As cinco curvas com símbolos a cheio dizem respeito a células com tolerância aceitável à irradiação; as outras duas curvas foram obtidas com células envelhecidas (resultantes de numerosas repicagens), que foi necessário substituir por novas células-mãe.

Com base nestes dados, foi determinada para dose mais elevada de irradiação não citotóxica (linha vertical a tracejado) o valor 5 J/cm. A linha horizontal a tracejado corresponde ao efeito máximo aceitável da irradiação a que se refere o ponto 1.4.2.2.

▼M3

B.42. SENSIBILIZAÇÃO CUTÂNEA: ENSAIO DE GÂNGLIOS LINFÁTICOS LOCAIS

INTRODUÇÃO

1. As Diretrizes da OCDE para o ensaio de produtos químicos (*OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*) e os métodos de ensaio da UE nelas baseados são revistos periodicamente à luz do progresso científico, das necessidades normativas em evolução e de considerações de bem-estar animal. Foi adotada anteriormente a versão original do método de ensaio de gânglios linfáticos locais para determinação da sensibilização cutânea no rato (método LLNA, de «*Local Lymph Node Assay*», *Test Guideline* 429 da OCDE, capítulo B.42 deste anexo) (1). Foram publicados em (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) elementos pormenorizados sobre a validação do referido método, bem como uma revisão dos trabalhos conexos. Com base na avaliação da experiência adquirida e dos dados científicos, procedeu-se à atualização do método LLNA (12). O presente ensaio é o segundo método concebido para avaliar o potencial de sensibilização da pele de animais por produtos químicos (substâncias e misturas). O outro método (*Test Guideline* 406 da OCDE, capítulo B.6 deste anexo) recorre a ensaios em cobaias, nomeadamente o ensaio de maximização na cobaia e o ensaio de Buehler (13). No que respeita ao bem-estar animal, o método LLNA é melhor do que o método B.6 e o *Test Guideline* 406 da OCDE (13). O presente método LLNA atualizado inclui uma série de normas de desempenho (apêndice 1), que podem ser utilizadas como elemento de validação de métodos de ensaio novos ou modificados, funcional e mecanisticamente similares ao método LLNA, em conformidade com os princípios do documento de orientação (*Guidance Document*) n.º 34 da OCDE (14).

2. O método LLNA estuda a fase de indução da sensibilização cutânea e fornece dados quantitativos adequados para a avaliação da resposta à dosagem. Note-se que os sensibilizantes ligeiros/moderados recomendados como produtos químicos de controlo positivo adequados para métodos de ensaio em cobaias (método B.6, *Test Guideline* 406 da OCDE) (13) também o são para o método LLNA (6) (8) (15). Neste método descreve-se, como possibilidade alternativa, uma abordagem LLNA reduzida (método rLLNA) que permite diminuir o número de animais utilizados numa percentagem que pode ir até 40 % (16) (17) (18). Pode recorrer-se a este método reduzido quando a regulamentação exigir que seja confirmada uma previsão negativa de potencial de sensibilização cutânea, desde que sejam observadas todas as outras especificações do protocolo LLNA aqui descritas. Uma previsão de resultado negativo deve basear-se em todas as informações disponíveis, como se refere no ponto 4. Antes de se recorrer ao método rLLNA, é necessário justificar claramente e fundamentar cientificamente a utilização do método. Se, contrariamente ao esperado, o método rLLNA der resultados positivos ou inconclusivos, pode ser necessário efetuar mais ensaios para interpretar ou clarificar os resultados obtidos. O método rLLNA não deve ser utilizado em estudos de identificação de perigos associados a substâncias sensibilizantes da pele quando forem necessárias informações de resposta à dosagem, como na subcategorização para efeitos do Regulamento (CE) n.º 1272/2008, relativo à classificação, rotulagem e embalagem de substâncias e misturas, e do Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos da ONU.

DEFINIÇÕES

3. As definições utilizadas figuram no apêndice 2.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES

4. O método LLNA constitui um método alternativo a utilizar na identificação de produtos químicos potencialmente sensibilizantes da pele. Isso não implica, necessariamente, que o método deve ser sempre utilizado em substituição de ensaios em cobaias (método B.6, *Test Guideline* 406 da OCDE) (13), mas apenas que é equivalente aos segundos e pode ser utilizado em alternativa, gerando normalmente resultados positivos ou negativos que dispensam confirmação. Antes de efetuar o estudo, o laboratório deve examinar todas as informações disponíveis sobre a substância em causa,

▼M3

nomeadamente a identificação e a estrutura química, as propriedades físico-químicas, os resultados de quaisquer outros ensaios de toxicidade *in vitro* ou *in vivo* da substância e dados toxicológicos sobre produtos químicos com estrutura semelhante. Esse exame destina-se a determinar se o método LLNA se adequa à substância (dada a incompatibilidade de alguns tipos de produtos químicos com o método LLNA – ver o ponto 5), bem como a facilitar a escolha das dosagens.

5. O método LLNA é um método *in vivo*, não eliminando, portanto, a utilização de animais na avaliação da atividade sensibilizante alérgica por contacto. Pode, no entanto, reduzir o número de animais utilizados para estes fins. Além disso, proporciona melhorias substanciais (menos dor e sofrimento) no modo como os animais são utilizados nos ensaios de sensibilização alérgica por contacto. O método LLNA baseia-se na observação de ocorrências imunológicas estimuladas por produtos químicos durante a fase indutora da sensibilização. Contrariamente aos ensaios em cobaias (método B.6, *Test Guideline* 406 da OCDE) (13), não exige a indução de reações de hipersensibilidade dérmica por agentes externos. Também não implica a utilização de nenhum adjuvante, ao contrário do que sucede no ensaio de maximização na cobaia (13), reduzindo assim a dor e sofrimento causados aos animais. Apesar das vantagens do método LLNA em relação ao método B.6 e ao *Test Guideline* 406 da OCDE, importa reconhecer que o método tem limitações que podem exigir o recurso a estes últimos (13) (por exemplo, falsos negativos no método LLNA para certos metais, falsos positivos para certos irritantes cutâneos – como no caso de alguns produtos químicos tensioativos (19) (20) – ou problemas de solubilidade da substância em estudo). Por outro lado, no caso das substâncias ou classes de substâncias químicas com grupos funcionais que, comprovadamente, suscitem dúvidas (21), pode ser necessário recorrer a ensaios em cobaias (método B.6; *Test Guideline* 406 da OCDE) (13). Além disso, tendo em conta a base de dados de validação – limitada e essencialmente constituída por formulações pesticidas –, é mais provável que o método LLNA dê resultados positivos para este tipo de substância em estudo do que o ensaio na cobaia (22). Todavia, ao testar formulações, pode encarar-se a possibilidade de incluir, como substâncias de referência, substâncias similares com resultados conhecidos, para demonstrar que o método LLNA funciona bem (ver o ponto 16). Salvaguardadas estas limitações, o método LLNA é potencialmente aplicável ao estudo de qualquer substância, a menos que esta possua alguma propriedade passível de comprometer a exatidão do método.

PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

6. O princípio básico subjacente ao método LLNA é que os sensibilizantes induzem uma proliferação de linfócitos nos gânglios linfáticos drenantes do local de aplicação da substância em estudo. Esta proliferação é proporcional à dosagem e à potência do alergénio aplicado e constitui um modo simples de obter uma medida quantitativa da sensibilização. Mede-se a proliferação e compara-se a proliferação média em cada grupo estudado com a proliferação média no grupo de controlo tratado com o excipiente. Determina-se a razão entre a proliferação média em cada grupo tratado e a proliferação observada em paralelo no grupo de controlo tratado com o excipiente; essa razão é denominada índice de estimulação (IE). Para que uma substância em estudo possa ser classificada de sensibilizante cutânea potencial, este índice deve ser ≥ 3. O presente método baseia-se no recurso à marcação radioativa *in vivo* para medir o aumento de número de células em proliferação nos gânglios linfáticos drenantes do sistema auricular. Podem, no entanto, utilizar-se outros indicadores para determinar o número de células em proliferação, desde que as normas de desempenho sejam totalmente cumpridas (apêndice 1).

▼M3

DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

Escolha da espécie animal

7. O rato é a espécie escolhida para este ensaio. Utilizam-se fêmeas adultas das estirpes CBA/Ca ou CBA/J, nulíparas e não grávidas. No início do estudo, os animais devem ter entre 8 e 12 semanas; a variação de peso dos animais entre si deve ser mínima e não deve exceder 20 % do peso médio dos mesmos. Podem ser utilizadas outras estirpes, bem como machos, quando houver dados suficientes que demonstrem não existirem diferenças significativas na resposta ao método LLNA relacionadas com a estirpe e/ou o sexo do animal.

Condições de alojamento e de alimentação

8. Os ratos devem ser alojados em grupo (23), a menos que se justifique cientificamente o seu alojamento individual. A temperatura do biotério deve ser de 22 °C ± 3 °C. A humidade relativa não deve ser inferior a 30 % e, de preferência, não deve exceder 70 %, exceto durante a limpeza do biotério. Idealmente, deve procurar manter-se entre 50 % e 60 %. A iluminação deve ser artificial, com uma sequência de 12 horas de luz seguidas de 12 horas de escuridão. Na alimentação, podem utilizar-se dietas convencionais de laboratório e deve ser fornecida água de beber sem restrições.

Preparação dos animais

9. Os animais são selecionados aleatoriamente, marcados de modo a permitir a identificação individual (mas não por marcação nas orelhas) e mantidos em gaiolas durante, pelo menos, cinco dias antes da aplicação das doses, para permitir a aclimatação às condições do laboratório. Antes do início do tratamento, examinam-se os animais, de modo a assegurar que não apresentam lesões cutâneas visíveis.

Preparação das soluções a aplicar

10. Os produtos químicos sólidos dissolvem-se ou suspendem-se em solventes/excipientes e, se necessário, diluem-se, antes da aplicação nas orelhas dos ratos. Os produtos líquidos podem ser aplicados tal e qual ou ser diluídos antes da aplicação. Os produtos químicos insolúveis, como os geralmente presentes nos dispositivos médicos, devem ser sujeitos a um processo de extração exaustivo com um solvente apropriado, a fim de nele concentrar para o ensaio todos os componentes extraíveis, antes da aplicação nas orelhas dos ratos. As substâncias em estudo devem ser preparadas diariamente, a menos que haja dados de estabilidade que demonstrem ser aceitável o seu armazenamento.

Verificação da fiabilidade

11. Utilizam-se produtos químicos de controlo positivo para demonstrar o desempenho adequado do ensaio, devendo obter-se uma resposta quantitativamente bem caracterizada, com sensibilidade adequada e reprodutível, a essas substâncias sensibilizantes. Recomenda-se a inclusão, em paralelo, de um produto químico de controlo positivo, para demonstrar a competência do laboratório na execução de cada ensaio e possibilitar a avaliação da reprodutibilidade e comparabilidade intra e interlaboratoriais. Algumas autoridades reguladoras exigem também um produto químico de controlo positivo em cada estudo, pelo que os laboratórios devem consultar as autoridades competentes antes de executarem o método LLNA. Aconselha-se, portanto, a utilização rotineira, em paralelo, de um produto químico de controlo positivo, para evitar a eventual necessidade de ensaios suplementares em animais decorrente do recurso apenas periódico a esses produtos químicos de controlo (ver o ponto 12). No método LLNA, o produto químico de controlo positivo deve induzir uma resposta positiva a um nível de exposição do qual se espere um aumento do índice de estimulação superior a 3 em relação ao grupo de controlo negativo. Deve escolher-se a dosagem do produto químico de controlo positivo de modo que este não

▼M3

cause irritação cutânea excessiva nem toxicidade sistémica e que a indução seja reprodutível, mas não excessiva (considera-se excessivo um índice de estimulação superior a 20). Os produtos químicos de controlo positivo preferidos são aldeído hexilcinâmico (n.º CAS 101-86-0) a 25 % numa mistura de acetona e azeite na proporção volúmica 4:1 e mercaptobenzotiazol (n.º CAS 149-30-4) a 5 % em *N,N*-dimetilformamida (ver o apêndice 1, quadro 1). Em certas circunstâncias, e perante justificação adequada, podem utilizar-se outros produtos químicos de controlo positivo que cumpram os critérios atrás referidos.

12. Embora seja recomendada a inclusão, em paralelo, de um grupo de controlo positivo, em algumas situações pode justificar-se que um laboratório que aplique o método LLNA regularmente (isto é, pelo menos uma vez por mês) efetue ensaios de controlo positivo apenas periódicos (a intervalos não superiores a seis meses) e mantenha uma base de dados histórica dos produtos químicos de controlo positivo que comprove a capacidade do laboratório de obter resultados reprodutíveis e exatos com esses produtos. A competência na execução do método LLNA pode demonstrar-se obtendo resultados positivos constantes com um produto químico de controlo positivo em pelo menos 10 ensaios independentes efetuados num período razoável (menos de um ano).

13. Deve incluir-se em paralelo um grupo de controlo positivo sempre que haja alguma alteração processual do método LLNA (por exemplo, alterações do pessoal formado, das matérias e/ou dos reagentes utilizados no método de ensaio, do equipamento utilizado neste último ou da origem dos animais estudados), devendo essas alterações ser documentadas nos relatórios laboratoriais. Deve analisar-se a incidência dessas alterações na adequação da base de dados históricos anteriormente estabelecida, ponderando a necessidade de criar uma nova base de dados históricos para documentar a coerência dos resultados obtidos com os produtos químicos de controlo positivo.

14. Os investigadores devem ter presente que a decisão de efetuar o estudo de produtos químicos de controlo positivo periodicamente, e não em paralelo, tem implicações na adequação e aceitabilidade dos resultados negativos dos estudos efetuados sem produto químico de controlo positivo em paralelo, no intervalo entre cada estudo de controlo positivo periódico. Por exemplo, se for obtido um resultado falso negativo num estudo de controlo positivo periódico, podem questionar-se os resultados negativos eventualmente obtidos para as substâncias em estudo no período compreendido entre o último estudo periódico aceitável de controlo positivo e o estudo periódico inaceitável de controlo positivo. Ao optar entre a inclusão em paralelo de produtos químicos de controlo positivo e um controlo positivo apenas periódico, devem ponderar-se cuidadosamente as consequências. Deve também ponderar-se a utilização de menos animais no grupo de controlo positivo em paralelo, se houver justificação científica para isso e o laboratório demonstrar, com base em dados históricos próprios, que podem ser utilizados menos ratos (12).

15. Embora se deva ensaiar o produto químico de controlo positivo num excipiente que reconhecidamente garanta coerência nas respostas (por exemplo, acetona e azeite na proporção volúmica 4:1), em determinadas situações regulamentares poderá ser também necessário efetuar o ensaio num excipiente não convencional (formulação clínica ou quimicamente pertinente) (24). Se o ensaio em paralelo de um produto químico de controlo positivo for efetuado com um excipiente diverso do da substância em estudo, deve incluir-se um controlo de excipiente para o produto químico de controlo positivo ensaiado em paralelo.

16. Se o estudo consistir na avaliação de substâncias de uma determinada classe química ou gama de respostas, o recurso a substâncias de referência pode ser útil para demonstrar que o método de ensaio funciona corretamente na deteção do potencial de sensibilização cutânea do tipo de substância em causa. Para que seja considerada adequada, uma substância de referência deve possuir as seguintes propriedades:

    — semelhança estrutural e funcional com a classe de substâncias em estudo,

    — características físico-químicas conhecidas,

    — dados corroborantes do método LLNA,

    — dados corroborantes de outros modelos animais e/ou de ensaios em pessoas.

▼M3

PROCEDIMENTO DE ENSAIO

Número de animais e níveis de dosagem

17. Utilizam-se, no mínimo, quatro animais por grupo de dosagem e um mínimo de três concentrações da substância em estudo, além de um grupo de controlo negativo em paralelo, tratado apenas com o excipiente da substância em estudo, e de um produto químico de controlo positivo (ensaiado em paralelo ou recentemente, consoante a política do laboratório acerca dos pontos 11 a 14). Deve ponderar-se o ensaio de várias doses do produto químico de controlo positivo, sobretudo quando este for ensaiado com intermitência. Os animais dos grupos de controlo devem ser manuseados e tratados de modo idêntico ao dos animais dos grupos tratados, exceto no que respeita à administração da substância em estudo.

18. A escolha da dosagem e do excipiente deve basear-se nas recomendações das referências (3) e (5). Selecionam-se normalmente doses consecutivas numa série de concentrações adequada, por exemplo, 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 %, etc. A seleção das séries de concentração utilizadas deve ter fundamentação científica. Na escolha de três concentrações consecutivas de modo que a concentração mais elevada maximize a exposição, evitando ao mesmo tempo a ocorrência de toxicidade sistémica e irritação cutânea local excessiva, devem ser tidas em conta as informações toxicológicas (por exemplo, referentes a toxicidade aguda e irritação dérmica), bem como estruturais e físico-químicas, disponíveis sobre a substância em estudo (e/ou sobre substâncias estruturalmente afins) (3) (25). Na ausência de tais informações, pode ser necessário um ensaio exploratório prévio (ver os pontos 21 a 24).

19. O excipiente não deve interferir no resultado do ensaio nem distorcê-lo, devendo ser escolhido de modo a maximizar a solubilidade e a obter a maior concentração possível numa solução ou suspensão adequada para aplicação da substância em estudo. Constituem excipientes adequados uma mistura de acetona e azeite na proporção volúmica 4:1, a *N,N*-dimetilformamida, a metiletilcetona, o propilenoglicol e o sulfóxido dimetílico (19), mas podem utilizar-se outros, desde que com fundamentação científica. Em certas situações, pode ser necessário efetuar um controlo adicional com um solvente utilizado na prática clínica ou a formulação na qual a substância em estudo é comercializada. Deve ter-se especial cuidado em assegurar que as substâncias hidrófilas sejam incorporadas num sistema (excipiente) que molhe a pele e não escorra de imediato, acrescentando solubilizadores adequados (por exemplo, Pluronic® L92 a 1 %). Devem, portanto, evitar-se os excipientes totalmente aquosos.

20. A utilização de gânglios linfáticos de ratos distintos possibilita a avaliação da variabilidade de animal para animal e a comparação estatística da diferença entre as medições relativas à substância em estudo e ao grupo de controlo do excipiente (ver o ponto 35). Por outro lado, se se dispuser de dados por animal, pode ponderar-se a redução do número de ratos no grupo de controlo positivo (12). Além disso, há autoridades reguladoras que exigem a apresentação de dados por animal. Todavia, algumas autoridades reguladoras podem aceitar a agregação de dados relativos a vários animais, caso em que os utentes podem optar por dados individualizados por animal ou pela agregação de dados relativos a séries de animais.

Ensaio exploratório prévio

21. Na ausência de informações que permitam determinar a dosagem máxima a ensaiar (ver o ponto 18), é necessário efetuar um ensaio exploratório prévio, a fim de definir a dosagem adequada a ensaiar pelo método LLNA. O objetivo deste ensaio exploratório consiste em fornecer orientações para a escolha da dosagem máxima a utilizar no estudo principal pelo método LLNA, caso não se disponha de informações sobre a concentração que induz toxicidade sistémica (ver o ponto 24) e/ou irritação cutânea local excessiva (ver o ponto 23). A dosagem máxima estudada deve ser uma concentração de 100 % da substância em estudo, no caso dos líquidos, ou a concentração máxima possível, no caso dos sólidos e das suspensões.

▼M3

22. O ensaio exploratório prévio é efetuado em condições idênticas às do estudo principal pelo método LLNA, mas não se avalia a proliferação nos gânglios linfáticos e podem utilizar-se menos animais por grupo de dosagem. Sugere-se o recurso a um ou dois animais por grupo de dosagem. Observam-se diariamente todos os ratos para verificar se apresentam sinais clínicos de toxicidade sistémica ou de irritação no local de aplicação. Regista-se o peso corporal de cada rato antes do ensaio e antes de o eutanasiar (dia 6). Observam-se as orelhas para verificar se têm eritema e atribui-se-lhes uma pontuação de acordo com o quadro 1 (25). Mede-se a espessura das orelhas com um instrumento adequado – por exemplo, um micrómetro digital ou um leitor de espessuras da Peacock – no dia 1 (antes da primeira dose), no dia 3 (cerca de 48 horas após a primeira dose) e no dia 6. Complementarmente, no dia 6 pode determinar-se a espessura das orelhas por pesagem de punções auriculares efetuadas depois da eutanásia dos animais. Uma pontuação de eritema ≥ 3 e/ou o aumento da espessura auricular em 25 % ou mais, em qualquer dia de medição, constituem indicadores de irritação cutânea local excessiva (26) (27). Para dosagem mais elevada no estudo principal pelo método LLNA, deve ser escolhida a dosagem da série de concentrações do ensaio exploratório prévio (ver o ponto 18) imediatamente inferior à que induz toxicidade sistémica e/ou irritação cutânea local excessiva.

Quadro 1

Pontuações de eritema

Observação	Pontuação
Ausência de eritema	0
Eritema muito ligeiro (quase impercetível)	1
Eritema bem definido	2
Eritema moderado a intenso	3
Eritema intenso (vermelhidão roxa) ou formação de escara que impede a pontuação do eritema	4

23. Além do referido acerca do aumento de 25 % da espessura auricular (26) (27), também se recorreu a aumentos estatisticamente significativos da espessura auricular dos ratos tratados, comparativamente aos ratos de controlo, para identificar produtos irritantes pelo método LLNA (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Os aumentos estatisticamente significativos da espessura auricular inferiores a 25 % não foram, porém, especificamente associados a irritação excessiva (30) (32) (33) (34).

24. Quando efetuadas no âmbito de uma avaliação integrada, as seguintes observações clínicas podem indiciar toxicidade sistémica (35) (36), podendo assim indicar a dosagem máxima a utilizar no método LLNA principal: alterações do funcionamento do sistema nervoso (por exemplo, piloereção, ataxia, tremores e convulsões); alterações comportamentais (por exemplo, agressividade, alterações das atividades higiénicas, alterações pronunciadas de atividade); alterações respiratórias (alterações da frequência e da intensidade da respiração, como dispneia, arfar e pieira) e da ingestão de alimentos e de água. Devem ainda ser tidos em conta na avaliação os sinais de letargia e/ou de apatia e quaisquer sinais clínicos de dor ou sofrimento mais do que ligeiros ou momentâneos, ou reduções de peso corporal superiores a 5 % entre o dia 1 e o dia 6, bem como a mortalidade. Os animais moribundos e os animais que manifestem sofrimento ou sinais de dor intensa e continuada devem ser eutanasiados (37).

▼M3

Sequência experimental do estudo principal

25. A sequência experimental do ensaio é a seguinte:

— *Dia 1:* Identificar individualmente e anotar o peso de cada animal e todas as observações clínicas. Aplicar no dorso de cada orelha 25 µl da diluição adequada da substância em estudo, do excipiente sozinho ou do produto químico de controlo positivo (ensaiado em paralelo ou recentemente, consoante a política do laboratório acerca dos pontos 11 a 15).

— *Dias 2 e 3:* Repetir o procedimento de aplicação efetuado no dia 1.

— *Dias 4 e 5:* Nenhum tratamento.

— *Dia 6:* Anotar o peso de cada animal. Injetar, através da veia caudal, 250 µl de tampão salino de fosfato (PBS) esterilizado contendo 20 µCi ($7{,}4 \times 10^5$ Bq) de ^{3}H-metiltimidina em todos os ratos do estudo e de controlo. Em alternativa, injetar 250 µl de PBS esterilizado, contendo 2 µCi ($7{,}4 \times 10^4$ Bq) de ^{125}I-iododesoxiuridina numa concentração 10^{-5} M em fluorodesoxiuridina, em todos os ratos, através da veia caudal. Eutanasiar os animais 5 horas depois. Excisar os gânglios linfáticos auriculares de drenagem, das orelhas de cada rato, e colocá-los em PBS, separadamente para cada animal (procedimento por animal); em alternativa, excisar os gânglios linfáticos de cada orelha e colocá-los agrupados em PBS, por grupo de tratamento (procedimento do tratamento agrupado). Para pormenores e esquemas da identificação e dissecação dos gânglios linfáticos, ver a referência (12). A fim de melhor avaliar a resposta cutânea local no estudo principal, podem ser incluídos no protocolo de estudo parâmetros suplementares, como a pontuação do eritema auricular ou medições da espessura auricular (com um medidor de espessura ou por pesagem de punções auriculares *post mortem*).

Preparação das suspensões celulares

26. Preparar suspensões unicelulares de células dos gânglios linfáticos, excisados bilateralmente, aplicando o procedimento por animal ou, em alternativa, o procedimento do tratamento agrupado, por desagregação mecânica suave através de um peneiro de aço inoxidável com malha de 200 µm, ou recorrendo a outra técnica aceitável para obtenção de suspensões unicelulares. Lavar duas vezes as células com PBS em excesso e precipitar o ADN com ácido tricloroacético a 5 %, a 4 °C, durante 18 horas (3). Ressuspender os sedimentos em 1 ml de ácido tricloroacético e transferir a suspensão para frascos de contador de cintilações contendo 10 ml de fluido de cintilação, para contagem de ^{3}H, ou diretamente para tubos de contagem gama, para contagem de ^{125}I.

Determinação da proliferação celular (radioatividade incorporada)

27. Medir a incorporação de ^{3}H-metiltimidina por contagem de cintilação β, em desintegrações por minuto (DPM). Medir a incorporação de ^{125}I-iododesoxiuridina por contagem de ^{125}I, exprimindo-a igualmente em DPM. Consoante o procedimento seguido, a incorporação é expressa em DPM/rato (procedimento por animal) ou em DPM/grupo de tratamento (procedimento do tratamento agrupado).

Método LLNA reduzido

28. Em determinadas situações, quando a regulamentação exigir que se confirme uma previsão negativa de potencial de sensibilização cutânea, pode recorrer-se a um protocolo rLLNA facultativo (16) (17) (18) que utiliza menos animais, desde que sejam observadas todas as outras especificações do protocolo LLNA aqui descritas. Antes de se recorrer ao método rLLNA, é necessário justificar claramente com base em argumentos científicos a utilização do método. Se forem obtidos resultados positivos ou inconclusivos, pode ser necessário efetuar mais ensaios para interpretar ou clarificar esses resultados.

▼M3

29. A redução numérica dos grupos de dosagem é a única diferença entre os protocolos de ensaio dos métodos LLNA e rLLNA, razão pela qual este último não permite obter informações de resposta à dosagem. Não deve, portanto, recorrer-se ao método rLLNA quando essas informações forem necessárias. Tal como no método de multidosagem LLNA, no método rLLNA avalia-se a concentração máxima da substância em estudo que não induz toxicidade sistémica manifesta nem irritação cutânea local excessiva no rato (ver o ponto 18).

OBSERVAÇÕES

Observações clínicas

30. Observar cuidadosamente cada rato pelo menos uma vez por dia, com vista à deteção de sinais clínicos, quer de irritação local no ponto de aplicação, quer de toxicidade sistémica. Anotar todas as observações, mantendo um registo para cada rato. Os planos de controlo devem incluir critérios para identificar prontamente os ratos que evidenciem níveis de toxicidade sistémica, irritação cutânea local excessiva ou corrosão da pele passíveis de justificarem a eutanásia do animal (37).

Pesos corporais

31. Tal como referido no ponto 25, mede-se o peso corporal de cada animal no início do ensaio e quando da eutanásia programada.

CÁLCULO DOS RESULTADOS

32. Os resultados correspondentes a cada grupo de tratamento exprimem-se em índice de estimulação. Caso se utilize o procedimento por animal, determina-se o índice de estimulação dividindo a média de DPM/rato, correspondente a cada grupo tratado com a substância em estudo e ao grupo de controlo positivo, pela média de DPM/rato do grupo de controlo do solvente/excipiente. O índice de estimulação médio para o grupo de controlo tratado com o excipiente é igual a 1. Caso se utilize o tratamento agrupado, determina-se o índice de estimulação dividindo a incorporação radioativa agregada correspondente a cada grupo de tratamento pela incorporação agregada do grupo de controlo do excipiente. O valor obtido é um índice de estimulação médio.

33. Para efeitos de decisão, consideram-se positivos os resultados de índice de estimulação ≥ 3. Todavia, ao ponderar se um resultado próximo do limite deve ou não ser considerado positivo, podem ter-se também em conta o grau de resposta à dosagem, a significância estatística e a coerência das respostas correspondentes ao solvente/excipiente e à substância de controlo positivo (4) (5) (6).

34. Se for necessário clarificar os resultados obtidos, devem examinar-se as propriedades da substância em estudo, nomeadamente se esta possui estrutura semelhante a sensibilizantes cutâneos conhecidos ou causa irritação cutânea local excessiva nos ratos, bem como a natureza da resposta à dosagem observada. Na referência (7) analisam-se em pormenor estes e outros aspetos.

35. A recolha de dados de radioatividade para cada rato possibilita uma análise estatística da existência, nos dados, de indicações de resposta à dosagem e do grau desta resposta. A avaliação estatística pode incluir uma avaliação da resposta à dosagem e comparações, convenientemente adaptadas, de grupos estudados (por exemplo, comparações par a par de um grupo correspondente a uma determinada dosagem com o grupo de controlo tratado com o excipiente ensaiado em paralelo). As análises estatísticas podem incluir, por exemplo, regressões lineares ou testes de William, para analisar tendências de resposta à dosagem, e testes de Dunnett, para comparações par a par. Na escolha de um método de análise estatística apropriado, o investigador deve estar atento a possíveis divergências das variâncias e a outros problemas conexos passíveis de exigirem uma transformação dos dados ou uma análise estatística não paramétrica. O investigador pode ainda ter de efetuar os cálculos de índice de estimulação e as análises estatísticas considerando alguns pontos e descartando outros (por vezes denominados «aberrantes»).

▼M3

DADOS E RELATÓRIOS

Dados

36. Os dados devem ser resumidos em quadros. Quando se seguir o procedimento por animal, indicar os valores de DPM correspondentes a cada animal, a média de DPM/animal do grupo, o parâmetro estatístico associado (desvio-padrão ou erro-padrão da média, por exemplo) e o índice de estimulação médio para cada grupo de dosagem, comparativamente ao grupo de controlo do excipiente ensaiado em paralelo. Quando se recorrer ao tratamento agrupado, indicar a média ou a mediana das desintegrações por minuto e o índice de estimulação médio de cada grupo de dosagem, comparativamente ao grupo de controlo do excipiente ensaiado em paralelo.

Relatório do ensaio

37. O relatório do ensaio deve incluir as seguintes informações:

Substâncias em estudo e de controlo:

— dados de identificação (por exemplo, números CAS e CE – caso existam –, origem, grau de pureza, impurezas conhecidas, número de lote),

— natureza física e propriedades físico-químicas (por exemplo, volatilidade, estabilidade, solubilidade),

— no caso das misturas, composição e percentagens relativas dos componentes;

Solvente/excipiente:

— dados de identificação (grau de pureza, concentração – se adequado –, volume utilizado),

— justificação da escolha do excipiente;

Animais utilizados nos ensaios:

— origem dos ratos CBA,

— estado microbiológico dos animais, caso seja conhecido,

— número e idade dos animais,

— origem dos animais, condições de alojamento, dieta, etc.;

Condições de ensaio:

— elementos sobre a preparação e aplicação da substância em estudo,

— justificação das dosagens escolhidas, incluindo os resultados do ensaio exploratório prévio eventualmente efetuado,

— concentrações do excipiente e da substância em estudo utilizadas e quantidade total desta aplicada,

— elementos sobre a qualidade dos alimentos e da água (incluindo o tipo de dieta e a origem desta, bem como a origem da água),

— elementos sobre a organização cronológica dos tratamentos e da colheita das amostras,

— métodos de medição da toxicidade,

— critérios definidos para que o estudo seja considerado positivo ou negativo,

— elementos sobre eventuais desvios ao protocolo e explicação do modo como estes afetam a realização e os resultados do estudo;

Verificação da fiabilidade:

— resumo dos resultados da última verificação de fiabilidade, incluindo informações sobre a substância em estudo, a concentração e o excipiente utilizados,

— dados do laboratório relativos a controlos positivos ensaiados em paralelo e/ou históricos e a controlos negativos ensaiados em paralelo,

▼M3

— se não tiver sido efetuado em paralelo um controlo positivo, a data do controlo positivo periódico mais recente e o relatório laboratorial correspondente, bem como um relatório que especifique os dados históricos de controlos positivos do laboratório nos quais se baseou a decisão de não efetuar um controlo positivo paralelo;

Resultados:

— peso de cada rato no início da dosagem e na altura da sua morte programada, bem como a média e o parâmetro estatístico associado (desvio-padrão ou erro-padrão da média, por exemplo) para cada grupo de tratamento,

— surgimento e evolução de sinais de toxicidade, incluindo irritação dérmica no local da aplicação (caso ocorra), para cada animal,

— quadro de valores de DPM e de índices de estimulação para cada grupo de tratamento, por rato (procedimento por animal) ou em valor médio/da mediana (procedimento do tratamento agrupado),

— média e parâmetro estatístico associado (desvio-padrão ou erro-padrão da média, por exemplo) de DPM/rato, para cada grupo de tratamento, e resultados da análise dos pontos aberrantes, também para cada grupo de tratamento, quando se aplica o procedimento por animal,

— índice de estimulação calculado e medida adequada da variabilidade de animal para animal, relativamente à substância em estudo e nos grupos de controlo, quando se aplica o procedimento por animal,

— resposta à dosagem,

— análises estatísticas que se justifiquem;

Análise dos resultados:

— comentário breve sobre os resultados obtidos; análise da resposta à dosagem, análises estatísticas que se justifiquem e conclusão sobre a classificação, ou não, da substância em estudo como sensibilizante cutânea.

REFERÊNCIAS

(1) OCDE (2002), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No 429. Paris. Disponível em: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(2) Kimber, I., Basketter, D.A. (1992). The murine local lymph node assay; collaborative studies and new directions: A commentary. *Food Chem. Toxicol*., 30, 165-169.

(3) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes, E.W., Basketter, D.A. (1994). The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicol*., 93, 13-31.

(4) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E., Hastings, K.L. (1998). Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. *J. Toxicol. Environ. Health*, 53, 563-79.

(5) Chamberlain, M., Basketter, D.A. (1996). The local lymph node assay: status of validation. *Food Chem. Toxicol*., 34, 999-1002.

(6) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I., Loveless, S.E. (1996). The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol*., 34, 985-997.

(7) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. (1998). Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol*., 36, 327-33.

▼M3

(8) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J., Van Loveren, H. (2000). A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. *Toxicol*., 146, 49-59.

(9) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001). ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34, 258-273.

(10) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001). ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34, 274-286.

(11) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001). ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34, 249-257.

(12) ICCVAM (2009). Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay, NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC. National Institute of Environmental Health Sciences. Disponível em: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf].

(13) OCDE (1992). Skin Sensitisation. OECD Guideline for Testing of Chemicals No 406. OCDE, Paris. Disponível em: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(14) OCDE (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14. OCDE, Paris. Disponível em: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(15) Dearman, R.J., Hilton, J., Evans, P., Harvey, P., Basketter, D.A., Kimber, I. (1998). Temporal stability of local lymph node assay responses to hexyl cinnamic aldehyde. *J. Appl. Toxicol*., 18, 281-284.

(16) Kimber, I., Dearman, R.J., Betts, C.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Kern, P.S., Patlewicz, G.Y., Basketter, D.A. (2006). The local lymph node assay and skin sensitisation: a cut-down screen to reduce animal requirements? *Contact Dermatitis*, 54, 181-185.

(17) ESAC (2007). Statement on the Reduced Local Lymph Node Assay (rLLNA), Direção-Geral da Comissão Europeia, Centro Comum de Investigação, Instituto de Saúde e Proteção dos Consumidores, Centro Europeu de Validação de Métodos Alternativos, abril de 2007. Disponível em: [http://ecvam.jrc.it/ft_doc/ESAC26_statement_rLLNA_20070525-1.pdf].

(18) ICCVAM (2009). The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) Test Method Evaluation Report. The Reduced Murine Local Lymph Node Assay: An Alternative Test Method Using Fewer Animals to Assess the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals and Products. NIH Publication Number 09-6439. Research Triangle Park, NC. National Institute of Environmental Health Sciences. Disponível em: [http://iccvam.niehs.nih.gov/].

(19) ICCVAM (1999). The Murine Local Lymph Node Assay: A Test Method for Assessing the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals/Compounds, The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No. 99-4494. Research Triangle Park, NC. National Institute of Environmental Health Sciences. Disponível em: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf].

▼M3

(20) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C., Wendel, A. (2008). Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). *Food Chem. Toxicol.*, 46, 1896-1904.

(21) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R., Mehling, A. (2009). Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. Reg. *Toxicol. Pharmacol.*, 55, 90-96.

(22) ICCVAM (2009). ICCVAM Test Method Evaluation Report. Assessment of the Validity of the LLNA for Testing Pesticide Formulations and Other Products, Metals, and Substances in Aqueous Solutions. NIH Publication Number 10-7512. Research Triangle Park, NC. National Institute of Environmental Health Sciences. Disponível em: [http://iccvam.niehs.nih.gov/].

(23) ILAR (1996). Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 7.ª edição. Washington, DC. National Academies Press.

(24) McGarry, H.F. (2007). The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. *Toxicol.*, 238, 71-89.

(25) OCDE (2002). Acute Dermal Irritation/Corrosion. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 404. Paris, França. Disponível em: http://www.oecd.org/document/40/0,3343,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html].

(26) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L., DeGeorge, G.L. (2007). Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. *Toxicologist*, 96, 235.

(27) ICCVAM (2009). Non-radioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC. National Institute of Environmental Health Sciences. Disponível em: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf].

(28) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S., Meade, B.J. (1998). Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. *Drug. Chem. Toxicol.*, 21, 195-206.

(29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P., Vohr, V.W. (1998). An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. *Toxicol. Appl. Pharmacol*., 153, 83-94.

(30) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B., Meade, B.J. (1998). A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. *Toxicol. Meth*., 8, 245-256.

(31) Hayes, B.B., Meade, B.J. (1999). Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. *Drug. Chem. Toxicol*., 22, 491-506.

(32) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R., Vohr, H.W. (2005). A European interlaboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol*., 212, 60-68.

(33) Vohr, H.W., Ahr, H.J. (2005). The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol*., 79, 721-728.

(34) Patterson, R.M., Noga, E., Germolec, D. (2007). Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract. *Environ. Health Perspect*., 115, 1023-1028.

(35) OCDE (1987). Acute Dermal Toxicity. OECD Guideline for Testing of Chemicals No 402. Paris, França. Disponível em: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

▼**M3**

(36) ICCVAM (2009). Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing In Vitro Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC. National Institute of Environmental Health Sciences. Disponível em: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm].

(37) OCDE (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment, No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7. OCDE, Paris. Disponível em: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

▼M3

Apêndice 1

Normas de desempenho para avaliação de métodos similares ou modificados propostos para ensaios LLNA de sensibilização cutânea

INTRODUÇÃO

1. O objetivo das normas de desempenho consiste em comunicar os termos com base nos quais é possível determinar se um método novo, sujeito ou não a direitos de propriedade (direitos de autor, marca comercial ou registo), é suficientemente exato e fiável para certas finalidades de ensaio. Estas normas baseiam-se em métodos de ensaio validados e aceites e podem ser utilizadas para avaliar a fiabilidade e exatidão de métodos similares (designados coloquialmente em inglês por «métodos "*me-too*" »), baseados em princípios científicos semelhantes e que medem ou preveem o mesmo efeito biológico ou tóxico (14).

2. Antes da adoção de métodos modificados (ou seja, aperfeiçoamentos a métodos de ensaio aprovados), deve avaliar-se o efeito das alterações propostas no desempenho do ensaio e em que medida essas alterações afetam as informações disponíveis para os outros componentes do processo de validação. Em função do número e da natureza das alterações propostas, dos dados de que se disponha e da documentação de apoio às alterações em causa, os métodos modificados devem ser sujeitos a um processo de validação idêntico ao descrito para um novo ensaio ou, se for caso disso, a uma avaliação limitada de fiabilidade e adequação com base em normas de desempenho estabelecidas (14).

3. Os métodos similares ou modificados cuja utilização no âmbito do presente método de ensaio seja proposta devem ser avaliados, com vista à determinação da sua fiabilidade e exatidão, utilizando produtos químicos representativos de toda a gama da escala de pontuação do método LLNA. Para evitar que sejam utilizados animais sem necessidade, recomenda-se vivamente que as entidades que desenvolvam os modelos consultem as autoridades competentes antes de iniciarem os estudos de validação com base nas normas de desempenho e orientações constantes do presente método.

4. Estas normas baseiam-se nas normas de desempenho harmonizadas dos E.U.A. (ICCVAM), da UE (ECVAM) e do Japão (JaCVAM) (12) para avaliação da validade de versões similares ou modificadas do método LLNA. As normas de desempenho são constituídas pelos componentes essenciais do método de ensaio, pelos produtos químicos de referência recomendados e por normas de exatidão e de fiabilidade que o método proposto deve cumprir ou suplantar.

I. **Componentes essenciais do método de ensaio**

5. Para garantir que um método LLNA similar ou modificado é funcional e mecanisticamente análogo ao método LLNA e mede o mesmo efeito biológico, devem constar do protocolo do método de ensaio os seguintes componentes:

— Aplicação tópica da substância em estudo em ambas as orelhas dos ratos;

— Medição da proliferação de linfócitos nos gânglios linfáticos drenantes do local de aplicação da substância em estudo;

— Medição da proliferação de linfócitos durante a fase indutora da sensibilização cutânea;

▼M3

— Escolha, como dosagem mais elevada da substância em estudo, da concentração máxima desta que não induz toxicidade sistémica nem irritação cutânea local excessiva nos ratos. Escolha, como dosagem mais elevada de um produto químico de referência de controlo positivo, de uma dose deste pelo menos tão elevada quanto a da estimativa da concentração necessária para gerar um índice de estimulação 3 (ver o quadro 1) sem causar toxicidade sistémica nem irritação cutânea local excessiva nos ratos;

— Inclusão em cada estudo, em paralelo, de um controlo do excipiente e, quando se justifique, também de um controlo positivo em paralelo;

— Utilização de pelo menos quatro animais por grupo de dosagem;

— Recolha de dados por animal ou agregados.

Se algum destes critérios não for preenchido, não é possível validar o método similar ou modificado com base nestas normas de desempenho.

II. **Lista mínima de produtos químicos de referência**

6. As normas de desempenho harmonizadas dos E.U.A. (ICCVAM), da UE (ECVAM) e do Japão (JaCVAM) (12) estabelecem uma lista mínima de 18 produtos químicos de referência a utilizar e quatro produtos químicos de referência facultativos (substâncias que geram resultados positivos falsos ou negativos falsos no método LLNA, comparativamente aos resultados obtidos em cobaias ou em pessoas – método B.6 ou *Test Guideline* 406 da OCDE – (13), podendo assim ser utilizados para demonstrar desempenhos iguais ao do método LLNA ou melhores) que são incluídos nas normas de desempenho do método LLNA. Os critérios de seleção desses produtos químicos foram os seguintes:

— A lista de produtos químicos de referência representa os tipos de substâncias normalmente utilizados para determinar potenciais de sensibilização cutânea e a gama de respostas que o método LLNA é capaz de medir ou de prever;

— A estrutura química das substâncias está bem definida;

— Dispõe-se para cada substância de dados de ensaios de gânglios linfáticos locais (método B.6 ou *Test Guideline* 406 da OCDE) (13) e, quando possível, de dados de ensaios em pessoas; e

— As substâncias estão facilmente disponíveis nos circuitos comerciais.

Os produtos químicos de referência recomendados constam do quadro 1. Nos estudos que recorram aos produtos químicos de referência propostos devem utilizar-se os excipientes correspondentes indicados no mesmo quadro. Se uma substância constante do quadro não estiver disponível, podem utilizar-se outras que preencham os critérios de escolha referidos, fundamentando devidamente esta opção.

▼M3

Quadro 1

Produtos químicos de referência recomendados para efeitos das normas de desempenho de métodos LLNA

Número	Produto químico (1)	N.º CAS	Estado	Excipiente (2)	EC3 (%) (3)	N (4)	0,5x – 2,0x EC3	Intervalo efetivo da EC3	Método LLNA versus ensaio em cobaias	Método LLNA versus sensibilização humana
1	Mistura de 5-cloro2-metil4-isotiazolin3-ona (CMI) e 2-metil4-isotiazolin3-ona (MI) (5)	26172-55-4/ 2682-20-4	Líquido	DMF	0,009	1	0,0045-0,018	NC	+/+	+/+
2	DNCB	97-00-7	Sólido	AAZ	0,049	15	0,025-0,099	0,02-0,094	+/+	+/+
3	4-Fenilenodiamina	106-50-3	Sólido	AAZ	0,11	6	0,055-0,22	0,07-0,16	+/+	+/+
4	Cloreto de cobalto	7646-79-9	Sólido	DMSO	0,6	2	0,3-1,2	0,4-0,8	+/+	+/+
5	Isoeugenol	97-54-1	Líquido	AAZ	1,5	47	0,77-3,1	0,5-3,3	+/+	+/+
6	2-Mercaptobenzotiazole	149-30-4	Sólido	DMF	1,7	1	0,85-3,4	NC	+/+	+/+
7	Citral	5392-40-5	Líquido	AAZ	9,2	6	4,6-18,3	5,1-13	+/+	+/+
8	HCA	101-86-0	Líquido	AAZ	9,7	21	4,8-19,5	4,4-14,7	+/+	+/+
9	Eugenol	97-53-0	Líquido	AAZ	10,1	11	5,05-20,2	4,9-15	+/+	+/+
10	Benzoato de fenilo	93-99-2	Sólido	AAZ	13,6	3	6,8-27,2	1,2-20	+/+	+/+
11	Álcool cinamílico	104-54-1	Sólido	AAZ	21	1	10,5-42	NC	+/+	+/+
12	Imidazolidinilureia	39236-46-9	Sólido	DMF	24	1	12-48	NC	+/+	+/+
13	Metacrilato de metilo	80-62-6	Líquido	AAZ	90	1	45-100	NC	+/+	+/+
14	Clorobenzeno	108-90-7	Líquido	AAZ	25	1	NA	NA	–/–	–/ (*)
15	Isopropanol	67-63-0	Líquido	AAZ	50	1	NA	NA	–/–	–/+

▼M3

Número	Produto químico ([1])	N.º CAS	Estado	Excipiente ([2])	EC3 (%) ([3])	N ([4])	0,5x – 2,0x EC3	Intervalo efetivo da EC3	Método LLNA versus ensaio em cobaias	Método LLNA versus sensibilização humana
16	Ácido láctico	50-21-5	Líquido	DMSO	25	1	NA	NA	–/–	–/ (*)
17	Salicilato de metilo	119-36-8	Líquido	AAZ	20	9	NA	NA	–/–	–/–
18	Ácido salicílico	69-72-7	Sólido	AAZ	25	1	NA	NA	–/–	–/–
Substâncias facultativas para demonstração de melhor desempenho relativamente ao LLNA										
19	Laurilsulfato de sódio	151-21-3	Sólido	DMF	8,1	5	4,05-16,2	1,5-17,1	+/–	+/–
20	Dimetacrilato de etilenoglicol	97-90-5	Líquido	MEK	28	1	14-56	NC	+/–	+/+
21	Xileno	1330-20-7	Líquido	AAZ	95,8	1	47,9-100	NC	+/ (**)	+/–
22	Cloreto de níquel	7718-54-9	Sólido	DMSO	5	2	NA	NA	–/+	–/+

Abreviaturas: AAZ = mistura de acetona e azeite na proporção volúmica 4:1; N.º CAS = Número de registo do *Chemical Abstracts Service*; DMF = *N*,*N*-dimetilformamida; DMSO = sulfóxido dimetílico; DNCB = 2,4--dinitroclorobenzeno; EC3 = estimativa da concentração necessária para gerar um índice de estimulação 3; Ensaio em cobaias = resultado do ensaio em cobaias (método B6 ou *Test Guideline* 406 da OCDE) (13); HCA = aldeído hexilcinâmico; LLNA = resultado do ensaio de gânglios linfáticos locais em ratos (método B.42 ou *Test Guideline* 429 da OCDE) (2); MEK = metiletilcetona; NA = não aplicável, visto o índice de estimulação ser inferior a 3; NC = não calculado, visto os dados provirem de um único estudo; Excipiente = excipiente utilizado no ensaio.

(*) Considerado não sensibilizante do ser humano, por não terem sido localizados resultados de ensaios clínicos de emplastros, por não figurar nas séries de alergénios para ensaios com emplastros e por não terem sido localizados casos registados de sensibilização de pessoas.

(**) Não estão disponíveis dados na cobaia.

([1]) Os produtos químicos devem ser preparados diariamente, a menos que haja dados de estabilidade que demonstrem ser aceitável o seu armazenamento.

([2]) Dados os efeitos potenciais dos diversos excipientes no desempenho do método LLNA, deve utilizar-se o excipiente recomendado para cada produto químico de referência (24) (32).

([3]) Valor médio quando se dispõe de mais do que um valor de EC3. No caso das substâncias com resultado negativo (índice de estimulação < 3), indica-se a maior concentração ensaiada.

([4]) Número de estudos pelo método LLNA de que provêm os dados.

([5]) Disponível comercialmente sob a designação «Kathon CG» (n.º CAS 55965-84-9), que é uma mistura 3:1 de CMI e de MI. A concentração de cada componente varia de 1,1 % a 1,25 % (CMI) e de 0,3 % a 0,45 % (MI). Os componentes inativos são sais de magnésio (21,5 % a 24 %) e nitrato de cobre (0,15 % a 0,17 %), sendo o restante constituído por água (74 % a 77 %). O Kathon CG é fornecido pela Sigma-Aldrich e pela Rohm and Haas (agora Dow Chemical Corporation).

▼M3

III. **Normas de fiabilidade e de exatidão**

7. A exatidão de um método LLNA similar ou modificado, avaliada com base na lista mínima prevista de 18 produtos químicos de referência, deve corresponder à das normas de desempenho de métodos LLNA, ou suplantá-la. O novo método ou o método modificado deve permitir uma decisão de classificação («sim» ou «não») correta. O novo método ou o método modificado pode, porém, não permitir classificar corretamente todos os produtos químicos de referência constantes da lista mínima. Se, por exemplo, a classificação atribuída a um dos sensibilizantes fracos for incorreta, poderá ponderar-se a demonstração de desempenho equivalente com base numa explicação da classificação incorreta e em dados suplementares adequados (por exemplo, resultados experimentais conducentes à classificação correta de outras substâncias, com propriedades físico-químicas e sensibilizantes similares às do produto químico de referência classificado incorretamente). Nessas circunstâncias, a validação de um método de ensaio LLNA similar ou modificado será apreciada caso a caso.

Reprodutibilidade intralaboratorial

8. Para determinar a reprodutibilidade intralaboratorial de um método de ensaio LLNA novo ou modificado, deve utilizar-se uma substância sensibilizante bem caracterizada pelo método LLNA. As normas de desempenho do método LLNA baseiam-se, para esse efeito, na variabilidade dos resultados de ensaios repetidos com aldeído hexilcinâmico. Para avaliar a fiabilidade intralaboratorial, devem obter-se estimativas de concentrações-limite (ECl) para o aldeído hexilcinâmico, em quatro ocasiões diferentes, com pelo menos uma semana de intervalo entre os ensaios. Considera-se a reprodutibilidade intralaboratorial aceitável se o laboratório for capaz de obter, em cada ensaio de aldeído hexilcinâmico, valores de ECl compreendidos entre 5 % e 20 %, correspondentes ao intervalo definido pela multiplicação por 0,5 e 2,0 da EC3 média especificada para o aldeído hexilcinâmico (10 %) no método LLNA (ver o quadro 1).

Reprodutibilidade interlaboratorial

9. Para determinar a reprodutibilidade interlaboratorial de um método de ensaio LLNA novo ou modificado, devem utilizar-se duas substâncias sensibilizantes bem caracterizadas pelo método LLNA. As normas de desempenho do método LLNA baseiam-se na variabilidade dos resultados de ensaios efetuados com aldeído hexilcinâmico e 2,4-dinitroclorobenzeno em laboratórios diferentes. Devem determinar-se valores de ECl a partir de um único estudo efetuado independentemente em, pelo menos, três laboratórios distintos. Para que fique demonstrada uma reprodutibilidade interlaboratorial aceitável, cada laboratório deve obter valores de ECl compreendidos entre 5 % e 20 %, para o aldeído hexilcinâmico, e entre 0,025 % e 0,1 %, para o 2,4-dinitroclorobenzeno, que correspondem ao intervalo definido, respetivamente, pela multiplicação por 0,5 e 2,0 das concentrações EC3 médias especificadas para o aldeído hexilcinâmico (10 %) e para o 2,4-dinitroclorobenzeno (0,05 %) no método LLNA (ver o quadro 1).

▼**M3**

Apêndice 2

Definições

Exatidão: Grau de acordo entre os resultados do método de ensaio e os valores de referência aceites. Constitui uma medida do desempenho do método e um dos aspetos da adequação. Este termo e o termo «concordância» são muitas vezes utilizados indistintamente para indicar a proporção de resultados corretos de um método de ensaio (14).

Substância de referência: Substância (sensibilizante ou não) utilizada como termo de comparação com a substância em estudo. Deve ter as seguintes propriedades: i) origem ou origens uniformes e fiáveis; ii) similaridade estrutural e funcional com a classe de substâncias em estudo; iii) características físico-químicas conhecidas; iv) disponibilidade de dados sobre os efeitos conhecidos; e v) potência conhecida situada na gama de reação pretendida.

Estimativa de concentração estabelecida como limite (ECl): Concentração de uma substância em estudo que se estima necessária para gerar um índice de estimulação indicativo de resposta positiva.

Estimativa de concentração «índice 3» (EC3): Concentração de uma substância em estudo que se estima necessária para gerar um índice de estimulação 3.

Falso negativo: Substância em estudo incorretamente considerada negativa ou inativa pelo método de ensaio, quando na realidade é positiva ou ativa.

Falso positivo: Substância em estudo incorretamente considerada positiva ou ativa pelo método de ensaio, quando na realidade é negativa ou inativa.

Perigo: Potencial de efeitos adversos na saúde ou no ambiente que só se manifestam se o grau de exposição for suficiente.

Reprodutibilidade interlaboratorial: Medida do grau em que laboratórios qualificados diferentes, utilizando o mesmo protocolo para ensaiar a mesma substância em estudo, conseguem obter resultados qualitativa e quantitativamente similares. Determina-se durante os processos de pré-validação e de validação. Indica em que medida um ensaio pode ser transferido com êxito para outro laboratório e também é designada por «reprodutibilidade entre laboratórios» (14).

Reprodutibilidade intralaboratorial: Medida do grau em que pessoal qualificado do mesmo laboratório nele consegue repetir resultados com êxito, em momentos diferentes, utilizando o mesmo protocolo. Também se designa por «reprodutibilidade no laboratório» (14).

Ensaio «me-too»: Expressão coloquial em inglês que designa um método de ensaio estrutural e funcionalmente similar a um método de referência validado e aceite. Um método com estas características é candidato a validação por similitude. O termo é sinónimo de «método de ensaio similar» (14).

Ponto aberrante: Observação que difere marcadamente dos outros valores de uma amostra aleatória de uma população.

Normas de desempenho: Normas associadas a um método de ensaio validado com base nas quais pode ser avaliada a comparabilidade de um método de ensaio proposto que lhe seja funcional e mecanisticamente similar. Integram essas normas: i) os componentes essenciais do método de ensaio, ii) uma lista mínima de produtos químicos de referência, selecionados entre os produtos químicos utilizados para demonstrar a aceitabilidade do desempenho do método de ensaio validado, e iii) os níveis de exatidão e de fiabilidade, comparáveis aos obtidos com o método de ensaio validado, que o método de ensaio proposto deve evidenciar ao ser avaliado utilizando a lista mínima de produtos químicos de referência (14).

Método de ensaio sujeito a direitos de propriedade: Método de ensaio cujas manufatura e distribuição são abrangidas por patentes, direitos de autor, marcas comerciais, etc.

▼**M3**

Garantia de qualidade: Processo de gestão no âmbito do qual a observância das normas de ensaio, das exigências e dos procedimentos de conservação de registos laboratoriais, bem como a exatidão dos dados transferidos, são avaliadas por pessoas independentes das que efetuam os ensaios.

Produtos químicos de referência: Produtos químicos selecionados para serem utilizados no processo de validação, cujas respostas aos sistemas de ensaio de referência *in vitro* ou *in vivo*, ou na espécie em causa, já são conhecidas. Estes produtos químicos devem ser representativos das classes de produtos químicos para as quais está prevista a utilização do método de ensaio e devem traduzir toda a gama de respostas (forte, fraca, negativa) que são de esperar dos produtos químicos aos quais o método se destina. Fases diferentes do processo de validação, métodos de ensaio diferentes e utilizações diferentes do mesmo ensaio podem exigir séries diferentes de produtos químicos de referência (14).

Adequação: Relação do ensaio com o efeito em causa; pertinência e utilidade do ensaio para o fim em vista. Traduz a medida em que o ensaio mede ou prevê corretamente o efeito biológico em causa. A adequação compreende a exatidão (concordância) do método de ensaio (14).

Fiabilidade: Medida em que, utilizando o mesmo protocolo, um método de ensaio pode ser continuadamente reproduzido no mesmo laboratório e em laboratórios diferentes. A fiabilidade é avaliada com base nos valores calculados das reprodutibilidades intralaboratorial e interlaboratorial (14).

Sensibilização cutânea: Processo imunológico que se manifesta quando um indivíduo sensível é exposto, por via tópica, a um alergénio químico indutor de uma resposta imunológica cutânea passível de gerar sensibilização por contacto.

Índice de estimulação (IE): Valor calculado para quantificar o potencial de sensibilização cutânea das substâncias estudadas; corresponde à razão entre a proliferação nos grupos tratados e a proliferação no grupo de controlo do excipiente ensaiado em paralelo.

Substância em estudo (ou produto químico em estudo): Qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado o presente método de ensaio.

Método de ensaio validado: Método de ensaio relativamente ao qual foram concluídos estudos de validação com vista a determinar a sua adequação (incluída a exatidão) e fiabilidade para um determinado fim. É importante referir que um método de ensaio validado pode não ser suficientemente exato e fiável para ser considerado aceitável para o fim pretendido (14).

▼B

B.43. **ESTUDO DE NEUROTOXICIDADE EM ROEDORES**

1. **MÉTODO**

O presente método é equivalente ao «Test Guideline» TG 424 da OCDE (1997).

O presente Método de Ensaio foi concebido para obter a informação necessária para confirmar ou conseguir uma melhor caracterização da potencial neurotoxicidade de substâncias químicas em animais adultos. Pode ser combinado com Métodos de Ensaio para estudos de toxicidade de dose repetida ou efectuado como um estudo independente. Recomenda-se a consulta do Documento de Orientação da OCDE sobre Estratégias e Métodos de Ensaios de Neurotoxicidade (1) para a concepção dos estudos baseados no presente Método de Ensaio. Este facto é particularmente importante no caso de se considerarem alterações das observações ou dos procedimentos de ensaio recomendados para uso rotineiro do presente método. O Documento de Orientação foi preparado para facilitar a selecção de outros procedimentos de ensaio para uso em circunstâncias específicas.

A avaliação de neurotoxicidade em relação ao desenvolvimento não é abrangida pelo presente método.

1.1. INTRODUÇÃO

Na avaliação das características tóxicas das substâncias químicas, é importante considerar o potencial de efeitos neurotóxicos. O Método de Ensaio para toxicidade sistémica de dose repetida inclui observações conducentes ao rastreio de neurotoxicidade potencial. O presente Método de Ensaio pode ser utilizado na concepção de um estudo para obtenção de informação suplementar ou para confirmação dos efeitos observados nos estudos de toxicidade sistémica de dose repetida. No entanto, uma ponderação da neurotoxicidade potencial de certo tipo de substâncias químicas pode ser indicativa de esta ser avaliada mais apropriadamente utilizando o presente método, mesmo na ausência de indicações prévias de existência de neurotoxicidade potencial provenientes de estudos de toxicidade sistémica de dose repetida. Tal ponderação pode incluir, por exemplo:

— observação dos sinais neurológicos ou lesões neuropatológicas em estudos de toxicidade diferentes dos estudos de toxicidade sistémica de dose repetida, ou

— relação estrutural ou outra informação que estabeleça uma ligação com outros neurotóxicos conhecidos.

Além disso, podem existir outras circunstâncias para as quais é apropriada a utilização do presente Método de Ensaio. Para informação detalhada, consultar a referência (1).

O presente método foi desenvolvido de modo a poder ser adaptado às necessidades específicas para a confirmação da neurotoxicidade histopatológica e comportamental de uma substância química, bem como a permitir uma caracterização e quantificação das respostas neurotóxicas.

▼B

No passado, a neurotoxicidade foi identificada como neuropatia envolvendo lesões neuropatológicas ou anomalias neurológicas, tais como convulsão, paralisia ou tremores. Apesar da neuropatia ser uma importante manifestação de neurotoxicidade, é actualmente claro que existem muitos outros sinais de toxicidade no sistema nervoso (por exemplo, perda de coordenação motora, deficiências sensoriais, disfunções da aprendizagem e da memória) que podem não se reflectir em neuropatia ou noutro tipo de estudos.

O presente Método de Ensaio de neurotoxicidade foi concebido para detectar os principais efeitos neurocomportamentais e neuropatológicos em roedores adultos. Apesar de os efeitos comportamentais, mesmo na ausência de alterações morfológicas, poderem reflectir um impacto nefasto no organismo, nem todas as alterações comportamentais são específicas do sistema nervoso. Assim, quaisquer alterações observadas devem ser avaliadas em conjunto com os dados histopatológicos, hematológicos ou bioquímicos relacionados, bem como com dados provenientes de outros tipos de toxicidade sistémica. O ensaio utilizado, no presente método, para fornecer uma caracterização e quantificação das respostas neurotóxicas inclui procedimentos histopatológicos e comportamentais específicos que podem ser confirmados por investigações electrofisiológicas e/ou bioquímicas (1) (2) (3) (4).

Os neurotóxicos podem actuar sobre o sistema nervoso em vários alvos e por diversos mecanismos. Dado que não é possível utilizar uma única série de ensaios para avaliar completamente o potencial neurotóxico de todas as substâncias, pode ser necessário utilizar outros ensaios *in vivo* ou *in vitro* específicos para o tipo de neurotoxicidade observada ou prevista.

O presente Método de Ensaio, pode também ser utilizado em conjunto com as orientações estabelecidas pelo Documento de Orientação da OCDE sobre Estratégias e Métodos de Ensaios de Neurotoxicidade (1), para a concepção de estudos destinados a uma caracterização suplementar ou um aumento da sensibilidade da quantificação da curva dose-efeito, de modo a obter uma melhor estimativa do nível sem efeito adverso observável ou a confirmar a perigosidade conhecida ou prevista de uma substância química. Por exemplo, os estudos podem ser concebidos para identificar e avaliar o(s) mecanismo(s) neurotóxico(s) ou para obter informação suplementar sobre dados previamente disponíveis a partir do uso de procedimentos de observação neurocomportamental e neuropatológica básicos. Tais estudos necessitam de dados não replicados que seriam obtidos pelo uso dos procedimentos padronizados recomendados no presente método, caso esses dados não se encontrem já disponíveis e não sejam considerados necessários para a interpretação dos resultados do estudo.

O presente estudo de neurotoxicidade, quer utilizado independentemente, quer em conjunto com outros métodos, permite obter informação para:

— identificar se o sistema nervoso central é afectado permanente ou reversivelmente pela substância química ensaiada;

— contribuir para a caracterização das alterações do sistema nervoso central associadas à exposição à substância química e para a compreensão do mecanismo subjacente;

▼B

— determinar as curvas dose-efeito e tempo-efeito, de modo a obter uma estimativa do nível sem efeito adverso observável (que pode ser utilizado para estabelecer critérios de segurança para a substância química).

O presente método utiliza a administração oral da substância de ensaio. Podem ser mais apropriadas outras vias de administração (por exemplo, dérmica ou por inalação), pelo que podem ser necessárias modificações dos procedimentos recomendados. A selecção ponderada, da via de administração, depende do perfil de exposição humana e da informação toxicológica e cinética disponível.

1.2. DEFINIÇÕES

Efeito adverso: qualquer alteração à normalidade relacionada com o tratamento que diminua a capacidade de um organismo para sobreviver, reproduzir-se ou adaptar-se ao meio ambiente.

Dose: quantidade aplicada da substância de ensaio. O valor da dose é expresso em peso (g, mg) de substância de ensaio por unidade de peso de animal de ensaio (por exemplo, mg/kg) ou em concentrações dietéticas constantes (ppm).

Dosagem: termo geral que inclui a dose, a sua frequência e a duração da aplicação da dose.

Neurotoxicidade: alteração adversa na estrutura ou função do sistema nervoso que resulta da exposição a um agente químico, biológico ou físico.

Neurotóxico: agente químico, biológico ou físico que apresenta potencial para causar neurotoxicidade.

NSEAO: abreviatura para nível sem efeito adverso observável; corresponde à maior dose ou ao maior nível de exposição para o qual não se observam efeitos adversos relacionados com o tratamento.

1.3. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

A substância química de ensaio é administrada por via oral ao longo de uma gama de doses a vários grupos de roedores de laboratório. São normalmente necessárias doses repetidas e o regime de dosagem pode ser de 28 dias, subcrónico (90 dias) ou crónico (1 ano ou mais). Os procedimentos estabelecidos no presente Método de Ensaio podem também ser usados para um estudo de neurotoxicidade aguda. Os animais são ensaiados de modo a permitir a detecção ou a caracterização de anomalias comportamentais e/ou neurológicas. Durante cada período de observação é avaliada uma gama de comportamentos que podem ser afectados por neurotóxicos. No final do ensaio, um subconjunto de animais de cada sexo e de cada grupo é submetido a perfusão *in situ* e são preparadas e examinadas secções do cérebro, medula espinal e nervos periféricos.

No caso do estudo ser efectuado independentemente para rastreio de neurotoxicidade ou caracterização dos efeitos neurotóxicos, os animais de cada grupo que não são utilizados para perfusão e histopatologia subsequente (consultar tabela 1) podem ser utilizados em procedimentos neurocomportamentais, neuropatológicos, neuroquímicos e electrofisiológicos específicos que podem complementar os dados obtidos nos exames padronizados necessários ao presente método (1). Estes procedimentos suplementares podem ser particularmente úteis nos casos em que as observações empíricas ou os efeitos previstos revelam um tipo ou alvo específicos de neurotoxicidade de determinado agente químico. Alternativamente, os restantes animais podem ser utilizados em avaliações, tais como as necessárias aos Métodos de Ensaio para estudos de dose repetida em roedores.

▼B

No caso de se combinarem os procedimentos do presente Método de Ensaio, com os de outros Métodos de Ensaio, é necessário um número suficiente de animais para satisfazer as necessidades de observações de ambos os estudos.

1.4. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.4.1. **Selecção de espécies animais**

A espécie preferida de roedores para ensaio é o rato, mas, caso seja apresentada uma justificação, podem ser utilizadas outras espécies de roedores. Devem ser utilizadas estirpes laboratoriais de uso corrente e animais adultos, jovens e saudáveis. As fêmeas devem ser nulíparas e não devem estar grávidas. A aplicação da dose deve começar o mais rapidamente possível após o desmame, preferencialmente com animais que não tenham completado ainda seis semanas e sempre com animais com menos de nove semanas. No entanto, nos casos em que o estudo é combinado com outros estudos, pode ser necessário ajustar este requisito de idade. No início do estudo a diferença de peso entre os animais deverá ser mínima, não podendo ultrapassar 20 % do peso médio de cada sexo. No caso de se efectuar um estudo de dose repetida de curta duração, como estudo preliminar do estudo de longo prazo, os animais utilizados em ambos os estudos devem ser da mesma estirpe e da mesma proveniência.

1.4.2. **Condições de alojamento e alimentação**

A temperatura do compartimento experimental dos animais deve ser de 22 °C (± 3 °C). A humidade relativa deverá ser 50 %-60 %, embora sejam aceitáveis valores entre um mínimo de 30 % e um máximo que, de preferência, não deverá exceder 70 %, salvo durante os períodos de limpeza do compartimento. A iluminação deve ser artificial, com sequências de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão. Os ruídos intensos intermitentes devem ser minimizados. A alimentação pode basear-se em dietas de laboratório convencionais, com fornecimento ilimitado de água para beber. Quando a substância de ensaio for administrada pela alimentação, a escolha da dieta poderá ser condicionada pela necessidade de assegurar a dosagem adequada. Os animais podem ser alojados individualmente ou em pequenos grupos do mesmo sexo.

1.4.3. **Preparação dos animais**

Os animais jovens e saudáveis são distribuídos aleatoriamente pelos grupos de tratamento e de controlo. As gaiolas devem ser dispostas de forma a minimizar possíveis efeitos derivados do seu posicionamento. Os animais são marcados de modo a permitir uma identificação individualizada e mantidos nas suas gaiolas durante, pelo menos, cinco dias antes do início da administração das doses, de modo a permitir que se aclimatem às condições laboratoriais.

1.4.4. **Via de administração e preparação das doses**

O presente Método de Ensaio aborda especificamente a administração oral da substância de ensaio. A forma de administração pode ser por sonda esofágica, através da alimentação ou da água de beber ou por cápsulas. Podem ser mais apropriadas outras vias de administração (por exemplo, dérmica ou por inalação), pelo que podem ser necessárias modificações dos procedimentos recomendados. A selecção ponderada da via de administração depende do perfil de exposição humana e da informação toxicológica e cinética disponível. Devem ser apresentadas uma justificação para a selecção da via de administração, bem como as modificações dos procedimentos do Método de Ensaio daí resultantes.

▼B

Se for necessário, a substância de ensaio pode ser dissolvida ou suspensa num excipiente apropriado. Recomenda-se que, sempre que possível, seja considerada em primeiro lugar a utilização de uma solução/suspensão aquosa; caso tal não seja viável, pode considerar-se o uso de uma solução/suspensão em óleo (por exemplo, óleo de milho); em último caso, poderá eventualmente recorrer-se ao uso de soluções/suspensões noutros excipientes. Devem conhecer-se as características tóxicas dos excipientes. Deverão ser tomadas em consideração as seguintes características do excipiente: efeitos na absorção, distribuição, metabolismo ou retenção da substância de ensaio, que possam modificar as suas características tóxicas e efeitos no consumo de alimentos, na ingestão de água ou no estado nutricional dos animais.

1.5. PROCEDIMENTOS

1.5.1. **Número e sexo dos animais**

No caso de o estudo ser efectuado independentemente, devem ser utilizados pelo menos 20 animais (10 fêmeas e 10 machos) em cada grupo de dose e de controlo para a avaliação das observações clínicas e funcionais detalhadas. Pelo menos cinco machos e cinco fêmeas, seleccionados dos grupos de 10 machos e 10 fêmeas, devem ser sujeitos a perfusão e utilizados para neuro-histopatologia detalhada no final do estudo. Nos casos em que apenas é observado um número limitado de animais, num determinado grupo de dose, para detecção de efeitos neurotóxicos, deve considerar-se a inclusão destes animais no grupo seleccionado para perfusão. No caso de o estudo ser efectuado em conjunto com um estudo de toxicidade de dose repetida, deve ser utilizado um número de animais adequado de modo a cumprir os objectivos de ambos os estudos. Na tabela 1 apresentam-se os números mínimos de animais por grupo para vários estudos combinados. No caso de se planearem grupos de mortes intermédias ou de recuperação para observação da reversibilidade, persistência ou ocorrência retardada de efeitos tóxicos pós-tratamento ou quando são consideradas observações suplementares, o número de animais deve ser aumentado de modo a assegurar que se encontra disponível o número de animais necessário para observação e histopatologia.

1.5.2. **Grupos de ensaio e de controlo**

Em geral devem ser utilizados pelo menos três grupos de dose e um grupo de controlo, mas se pela avaliação de outros dados não forem previstos quaisquer efeitos a uma dose repetida de 1 000 mg/kg de peso corporal/dia pode ser efectuado um teste-limite. Caso não se encontrem disponíveis dados adequados, pode ser efectuado um estudo preliminar de avaliação da gama, de modo a permitir a determinação das doses a utilizar. Os animais do grupo de controlo devem ser tratados da mesma maneira que os animais dos grupos de ensaio, com excepção do tratamento com a substância de ensaio. Caso seja utilizado um excipiente, o grupo de controlo deverá receber o volume máximo de excipiente utilizado no ensaio.

1.5.3. **Teste de fiabilidade**

O laboratório que efectua o estudo deve apresentar dados comprovativos da sua capacidade para efectuar o estudo e relativos à sensibilidade dos procedimentos utilizados. Tais dados devem provar a capacidade de detectar e quantificar, como apropriadas, alterações nos diferentes critérios específicos recomendados para observação, tais como sinais autonómicos, reactividade sensorial, força de preensão dos membros e actividade motora. Podem ser consultadas as referências 2 a 9 para informações sobre substâncias químicas que provocam diferentes respostas neurotóxicas e que podem ser utilizadas como controlos positivos. Podem ser utilizados dados históricos desde que os procedimentos experimentais não sejam alterados. Recomenda-se uma actualização periódica dos dados históricos. Caso o laboratório executante modifique alguns elementos essenciais da execução do ensaio ou procedimentos, devem obter-se novos dados comprovativos de que a sensibilidade dos procedimentos não foi alterada.

▼B

1.5.4. **Selecção da dose**

A escolha dos níveis de dose deverá tomar em consideração todos os dados de toxicidade e cinética existentes para a substância de ensaio ou as substâncias relacionadas. Deve ser seleccionado o nível de dose mais elevado que induza efeitos neurotóxicos ou efeitos tóxicos sistémicos evidentes. Deve seleccionar-se uma sequência descendente de níveis de dose que permita detectar qualquer resposta relacionada com a dose e determinar o nível sem efeito adverso observável (NSEAO) ao nível de dose mais baixo. Em princípio, os níveis de dose devem ser estabelecidos de modo a permitir distinguir entre os efeitos tóxicos primários no sistema nervoso e os efeitos relacionados com toxicidade sistémica. Em muitos casos, a melhor forma de estabelecer estas sequências consiste no espaçamento das doses em dois a três intervalos. A adição de um quarto grupo de ensaio é muitas vezes preferível ao uso de intervalos muito grandes entre as dosagens (ou seja, com um factor superior a 10). Nos casos em que existe uma estimativa razoável da exposição humana, esta deve também ser tomada em consideração.

1.5.5. **Teste-limite**

Se um ensaio com um nível de dose oral de pelo menos 1 000 mg/kg de peso corporal/dia, realizado de acordo com os procedimentos descritos neste estudo, não provocar efeitos neurotóxicos observáveis e se, além disso, os dados existentes sobre compostos estruturalmente relacionados com a substância de ensaio não sugerirem a possível ocorrência de toxicidade, poderá considerar-se desnecessário realizar um ensaio completo com três níveis de dose. Nos casos em que se preveja exposição humana poderá ser necessário aumentar o nível de dose oral no ensaio-limite. Quando se usam outras formas de administração, como inalação ou aplicação cutânea, as propriedades físico-químicas da substância de ensaio são muitas vezes indicativas e limitativas do nível máximo de exposição praticável. Para a execução do estudo oral agudo, a dose para o teste-limite deve ser, no mínimo, de 2 000 mg/kg.

1.5.6. **Administração de doses**

A aplicação da dose da substância de ensaio nos animais é efectuada diariamente, sete dias por semana, durante um período de pelo menos 28 dias. O uso de um período de dosagem de cinco dias ou inferior deve ser justificado. A administração por sonda esofágica deve ser feita, de preferência, numa toma única, usando um tubo estomacal ou uma cânula de intubação apropriada. O volume máximo de líquido que pode ser administrado de cada vez depende do tamanho do animal de ensaio. O volume não deve exceder 1 ml/100 g de peso corporal. Para soluções aquosas, contudo, pode ser considerada a dose de 2 ml/100 g de peso corporal. Deve minimizar-se a variabilidade do volume de ensaio efectuando ajustes nas concentrações, de forma a assegurar a constância do volume em todos os níveis de dose; exceptuam-se os casos em que se utilizam substâncias irritantes ou corrosivas, que normalmente exercem efeitos exacerbados quando aplicadas em concentrações mais elevadas.

É importante assegurar que as quantidades da substância de ensaio administradas através da alimentação ou da água de beber não interferem nas exigências normais de nutrição ou de consumo de água. Quando a substância de ensaio for incorporada na alimentação pode utilizar-se uma concentração alimentar constante (ppm) ou, alternativamente, um nível de dose constante em relação ao peso corporal dos animais; deve especificar-se o método escolhido para o ensaio. No caso de uma substância administrada por sonda esofágica, a dose deve ser administrada todos os dias à mesma hora, devendo ser ajustada pelo menos uma vez por semana a fim de se manter uma dose constante em relação ao peso corporal do animal. No caso de se efectuar um estudo de dose repetida, como estudo preliminar de um estudo de longo prazo, deve utilizar-se uma dieta semelhante em ambos os estudos. Nos estudos de toxicidade aguda, se não for possível a administração de uma toma única, a dose pode ser administrada em fracções menores ao longo de um período não superior a 24 horas.

▼B

1.6. OBSERVAÇÕES

1.6.1. **Frequência das observações e ensaios**

Nos estudos de dose repetida, o período de observação deve abranger o período de dosagem. Nos estudos de toxicidade aguda deve ser observado um período de 14 dias após o tratamento. As observações devem também abranger este período para os animais em grupos-satélite que foram mantidos sem exposição durante o período após o tratamento.

As observações devem ser efectuadas com uma frequência suficiente para maximizar a probabilidade de detecção de qualquer anomalia comportamental e/ou neurológica. As observações devem ser, preferencialmente, efectuadas à mesma hora, todos os dias, tendo em conta o período de pico previsto de efeitos após aplicação da dose. Na tabela 2 apresenta-se resumida a frequência das observações clínicas, bem como dos ensaios funcionais. No caso de existirem dados cinéticos ou outros dados obtidos em estudos prévios indicativos da necessidade de se utilizarem diferentes momentos de observação, ensaios ou períodos de observação posteriores, deve adoptar-se um calendário alternativo de modo a obter o máximo de informação. Deve apresentar-se uma justificação para as alterações introduzidas no calendário.

1.6.1.1. *Observações do estado de saúde geral e da mortalidade/morbilidade*

Todos os animais devem ser observados cuidadosamente, pelo menos uma vez por dia, para avaliar o seu estado de saúde geral, bem como, pelo menos duas vezes por dia, para avaliar a mortalidade e morbilidade.

1.6.1.2. *Observações clínicas pormenorizadas*

Devem ser efectuadas observações clínicas pormenorizadas em todos os animais seleccionados para este fim (consultar a tabela 1), uma vez antes da primeira exposição (de modo a permitir a comparação entre os diferentes animais) e, posteriormente, a diferentes intervalos, consoante a duração do estudo (consultar a tabela 2). Devem ser também efectuadas observações clínicas pormenorizadas nos grupos-satélite de recuperação no final do período de recuperação. As observações clínicas pormenorizadas devem ser efectuadas no exterior do compartimento experimental, numa arena-padrão. Devem ser registadas cuidadosamente utilizando sistemas de pontuação que incluam escalas de critérios ou de pontuação para cada medição das observações. Os critérios ou escalas utilizados devem ser explicitamente definidos pelo laboratório de ensaio. Deve assegurar-se que as variações das condições de ensaio são mínimas (não sistematicamente relacionadas com o tratamento) e que as observações são efectuadas por pessoal especializado sem conhecimento do tratamento efectuado.

Recomenda-se que as observações sejam efectuadas de um modo estruturado, em que se aplicam sistematicamente critérios bem definidos (incluindo a definição de «gama» normal) a cada animal, em cada observação. A «gama normal» deve ser apropriadamente documentada. Devem ser registados todos os sinais observados. Sempre que possível, deve também ser registada a intensidade dos sinais observados. As observações clínicas devem incluir, entre outros aspectos, alterações na pele, pêlo, olhos, membranas mucosas, ocorrência de secreções e excreções e actividade autónoma (por exemplo, lacrimação, erecção pilosa, tamanho da pupila, padrão respiratório anormal e/ou respiração pela boca, quaisquer sinais pouco usuais de urina ou defecação e urina descorada).

▼B

Devem ser registadas quaisquer respostas pouco usuais relativas à posição corporal, nível de actividade (por exemplo, maior ou menor exploração da arena-padrão) e coordenação dos movimentos. Também devem ser registadas alterações na marcha (por exemplo, marcha bamboleante, ataxia), postura (por exemplo, dorso arqueado) e reactividade ao manuseamento, colocação ou outros estímulos ambientais, bem como a presença de movimentos clónicos ou tónicos, convulsões ou tremores, estereótipos (por exemplo, higiene excessiva, movimentos de cabeça pouco usuais, locomoção em círculos repetitiva) ou comportamento anómalo (por exemplo, morder ou lamber excessivamente, automutilação, andar para trás, vocalização) ou agressão.

1.6.1.3. *Ensaios funcionais*

Tal como para o caso das observações clínicas pormenorizadas, devem ser efectuados ensaios funcionais uma vez antes da exposição e frequentemente após a exposição nos animais seleccionados para este fim (consultar a tabela 1). A frequência dos ensaios funcionais depende também da duração do estudo (consultar a tabela 2). Além dos períodos de observação, estabelecidos na tabela 2, as observações funcionais dos grupos-satélite de recuperação devem também ser efectuadas o mais próximo possível da morte terminal. Os ensaios funcionais devem incluir a reactividade sensorial a estímulos de várias tipos [por exemplo, estímulos auditivos, visuais e proprioceptivos (5) (6) (7)], a avaliação da força de preensão dos membros (8) e a avaliação da actividade motora (9). A actividade motora deve ser medida com um dispositivo automático capaz de detectar tanto aumentos como diminuições de actividade. Caso seja utilizado outro sistema definido, este deve ser quantitativo e a sua sensibilidade e fiabilidade devem ser comprovadas. Cada dispositivo deve ser ensaiado para assegurar a fiabilidade ao longo do tempo e a consistência entre os diferentes dispositivos. Nas respectivas referências apresenta-se informação detalhada sobre os procedimentos a seguir. Caso não existam quaisquer dados (por exemplo, relações estrutura-actividade, dados epidemiológicos, outros estudos toxicológicos) indicativos dos potenciais efeitos neurológicos, deve ser considerada a inclusão de ensaios mais especializados de função sensorial e motora ou de aprendizagem e memória de modo a que estes possíveis efeitos sejam examinados mais pormenorizadamente. Na referência (1) apresentam-se informações adicionais sobre os ensaios especializados e sua utilização.

Excepcionalmente, os animais que apresentem sinais de toxicidade numa extensão que afecte significativamente o ensaio funcional podem ser excluídos deste ensaio. Deve ser apresentada uma justificação para a exclusão de animais do ensaio funcional.

1.6.2. **Peso corporal e consumo de alimento/água**

Para estudos com duração até 90 dias, todos os animais devem ser pesados, pelo menos, uma vez por semana, e devem ser feitas medições do consumo de alimentos (consumo de água, caso a substância de ensaio seja administrada por este meio) pelo menos semanalmente. Para estudos de longo prazo, todos os animais devem ser pesados pelo menos uma vez por semana durante as 13 primeiras semanas e seguidamente pelo menos de 4 em 4 semanas. Devem ser feitas medições do consumo de alimentos (consumo de água, caso a substância de ensaio seja administrada por este meio), pelo menos semanalmente, nas primeiras 13 semanas, e seguidamente com um intervalo de cerca de três meses, excepto se o estado de saúde ou as variações de peso corporal indicarem que se deve fazer com outra periodicidade.

▼B

1.6.3. **Oftalmologia**

Para estudos de duração superior a 28 dias deve ser efectuado um exame oftalmológico, utilizando um oftalmoscópio ou um instrumento equivalente adequado, antes da administração da substância de ensaio e no final do estudo. Preferencialmente este exame deve ser feito a todos os animais ou, pelo menos, aos animais dos grupos de doses elevadas e dos grupos de controlo. Todos os animais devem ser examinados caso sejam detectadas alterações oculares ou caso os sintomas clínicos assim o indiquem. Para estudos de longo prazo, o exame oftalmológico deve também ser efectuado no final de 13 semanas. Não é necessário efectuar os exames oftalmológicos se existirem dados disponíveis de outros estudos com duração semelhante e com níveis de dose semelhantes.

1.6.4. **Hemograma e química clínica**

Se o estudo de neurotoxicidade for efectuado em conjunto com um estudo de toxicidade sistémica de dose repetida, devem ser efectuadas análises clínicas (hemograma e química clínica), tal como estabelecido no respectivo método do estudo de toxicidade sistémica. A recolha das amostras deve ser efectuada de modo a minimizar quaisquer potenciais efeitos no comportamento neuronal.

1.6.5. **Histopatologia**

O exame neuropatológico deve ser concebido a fim de complementar e aprofundar as observações efectuadas durante a fase *in vivo* do estudo. Os tecidos provenientes de, pelo menos, cinco animais de cada grupo do mesmo sexo (consultar a tabela 1 e o parágrafo seguinte) devem ser fixados *in situ* por utilização de técnicas de perfusão e fixação comummente adoptadas (consultar a referência 3, capítulo 5, e a referência 4, capítulo 50). Devem ser registadas quaisquer alterações importantes que sejam observadas. No caso de o estudo ser efectuado independentemente para rastreio de neurotoxicidade ou para caracterizar efeitos neurotóxicos, os animais que não sejam utilizados podem sê-lo em procedimentos neurocomportamentais (10) (11), neuropatológicos (10) (11) (12) (13), neuroquímicos (10) (11) (14) (15) e electrofisiológicos específicos que podem complementar os procedimentos e exames descritos ou podem ser acrescentados aos animais sujeitos a exame histopatológico. Estes procedimentos complementares têm um interesse especial quando as observações empíricas ou os efeitos previstos são indicativos de um tipo ou alvo específicos para a neurotoxicidade (2) (3). Os animais não utilizados podem, alternativamente, sê-lo em avaliações patológicas de rotina tal como descritas no método para estudos de dose repetida.

Deve ser utilizada uma técnica de coloração convencional, tal como hematoxilina ou eosina (H&E), em todas as amostras de tecidos, que devem ser fixadas em parafina e examinadas ao microscópio. Caso sejam observados sintomas de neuropatia periférica ou haja suspeitas nesse sentido, devem ser examinadas amostras de tecido nervoso periférico fixado em plástico. Os sintomas clínicos podem igualmente sugerir o exame a locais adicionais ou a utilização de técnicas de coloração especiais. Podem obter-se orientações sobre os locais adicionais a examinar em (3) e (4). Pode também ser útil a utilização de técnicas de coloração especiais apropriadas à demonstração de alterações patológicas específicas (18).

▼B

Os segmentos representativos dos sistemas nervosos central e periférico devem ser sujeitos a exame histopatológico (consultar a referência 3, capítulo 5, e a referência 4, capítulo 50). As áreas a examinar devem normalmente incluir: o cérebro anterior, o centro do cérebro, incluindo uma secção através do hipocampo, o mesencéfalo, o cerebelo, a ponte de Varolio, a *medulla oblongata*, o olho, incluindo o nervo óptico e a retina, a espinal medula ao nível das protuberâncias cervical e lombar, os gânglios da raiz dorsal, as fibras das raízes dorsal e ventral, o nervo ciático proximal, o nervo tibial proximal (no joelho) e as ramificações do nervo tibial nos gémeos. Devem ser examinadas as secções coronal, transversal e longitudinal da espinal medula e dos nervos periféricos. Deve ser dada especial atenção à vasculatura do sistema nervoso. Deve ser igualmente analisada uma amostra de músculo esquelético, nomeadamente, gémeos. Deve ser prestada especial atenção aos locais com estrutura e padrão celular e fibroso bi SNC e SNP que se saiba serem particularmente vulneráveis a substâncias neurotóxicas.

Podem obter-se orientações sobre as alterações neuropatológicas que resultam tipicamente da exposição a substâncias tóxicas nas referências (3) e (4). Recomenda-se um exame minucioso das amostras de tecidos, no qual são inicialmente comparados os cortes seccionais obtidos no grupo de dose mais elevada com os obtidos no grupo de controlo. Caso não sejam observadas quaisquer alterações neuropatológicas nas amostras provenientes desses grupos, não é necessário efectuar quaisquer análises subsequentes. Caso sejam observadas alterações neuropatológicas no grupo de dose mais elevada, as amostras de cada um dos tecidos potencialmente afectados provenientes dos grupos de doses intermédia e reduzida devem ser codificadas e analisadas sequencialmente.

Caso sejam detectados, no decorrer do exame qualitativo, quaisquer sintomas de alterações neuropatológicas, deve ser efectuado um segundo exame a todas as regiões do sistema nervoso que apresentem tais alterações. Cortes seccionais provenientes de todos os grupos de dosagem de cada uma das regiões potencialmente afectadas devem ser codificados e examinados ao acaso, sem conhecimento do respectivo código. Devem ser registadas a frequência e gravidade de cada lesão detectada. Após a classificação de todas as regiões em todos os grupos de dosagem, o código pode ser revelado e pode ser efectuada a análise estatística de modo a avaliar as relações dose-efeito. Devem descrever-se exemplos para os diferentes graus de gravidade das várias lesões.

Os dados neuropatológicas devem ser avaliados no contexto das observações comportamentais e das medidas efectuadas, assim como de quaisquer outros dados provenientes de estudos de toxicidade sistémica da substância de ensaio efectuados anterior ou simultaneamente.

2. DADOS

2.1. TRATAMENTO DOS RESULTADOS

Devem apresentar-se os dados individuais. Além disso, todos os dados devem ser resumidos em forma tabular, indicando, para cada grupo de ensaio ou de controlo, o número de animais no início do ensaio, o número de animais encontrados mortos durante o ensaio ou sacrificados a fim de evitar dor, o momento de todas as mortes (espontâneas ou provocadas), o número de animais apresentando sintomas de toxicidade, uma descrição dos sintomas de toxicidade observados (incluindo o momento do aparecimento, a duração, o tipo e a gravidade), o número de animais que apresentam lesões, incluindo o tipo e a gravidade de tais lesões.

▼B

2.2. AVALIAÇÃO E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados do estudo devem ser avaliados em termos da incidência, gravidade e correlação entre os efeitos observados aos níveis neurocomportamental e neuropatológico (assim como os efeitos neuroquímicos e electrofisiológicos, caso sejam efectuados quaisquer exames complementares) e quaisquer outros efeitos adversos observados. Sempre que possível, os resultados numéricos devem ser avaliados através de um método estatístico adequado e de utilização comum. Os métodos estatísticos devem ser determinados durante o planeamento do estudo.

3. **RELATÓRIO**

RELATÓRIO DO ENSAIO

O relatório do ensaio deverá incluir as seguintes informações:

Substância de ensaio:

— natureza física (incluindo isómeros, pureza e propriedades físico-químicas);

— dados de identificação.

Excipiente (se apropriado):

— justificação para escolha do excipiente.

Animais de ensaio:

— espécie/estirpe usada;

— número, idade e sexo dos animais;

— proveniência, condições de alojamento, aclimatização, dieta, etc.;

— peso individual dos animais no início do ensaio.

Condições do ensaio:

— informação pormenorizada sobre a formulação da substância de ensaio/preparação da dieta, concentração atingida, estabilidade e homogeneidade da preparação;

— especificação das doses administradas, incluindo dados pormenorizados sobre o excipiente, volume e forma física do material administrado;

— informação pormenorizada sobre a administração da substância de ensaio;

— justificações para a escolha dos diferentes níveis de dosagem;

— justificações para a escolha da via de administração e a duração do ensaio;

— conversão da concentração da substância de ensaio na dieta/água de beber (ppm) para a dose real (mg/kg de peso corporal/dia), se aplicável;

— informação pormenorizada sobre a qualidade dos alimentos e da água.

Observações e procedimentos de ensaio:

— informação pormenorizada sobre a atribuição dos animais de cada grupo aos diferentes subgrupos de perfusão;

— informação pormenorizada sobre os sistemas de classificação, incluindo escalas de classificação e critérios para cada medida efectuada nas observações clínicas aprofundadas;

▼B

— informação pormenorizada sobre os ensaios funcionais da reacção sensorial aos estímulos de diferentes origens (por exemplo, auditivos, visuais e proprioceptivos); da avaliação da força de preensão dos membros e da actividade motora (incluindo informação pormenorizada sobre dispositivos automáticos de detecção de actividade); e de outros procedimentos efectuados;

— informação pormenorizada sobre os exames oftalmológicos e, caso seja adequado, análises clínicas (hemograma e química clínica) com valores relevantes de linha de base;

— informação pormenorizada sobre os procedimentos neurocomportamentais, neuropatológicos, neuroquímicos e electrofisiológicos específicos.

Resultados:

— peso corporal/alterações do peso corporal, incluindo o peso corporal na altura da morte;

— consumo de alimento e consumo de água, sempre que necessário;

— dados sobre a resposta à toxicidade para cada sexo e nível de dosagem, incluindo sintomas de toxicidade ou mortalidade;

— natureza, gravidade e duração (momento do aparecimento e desenvolvimento subsequente) dos efeitos detectados em observações clínicas aprofundadas (reversíveis ou não);

— descrição pormenorizada de todos os resultados dos ensaios funcionais;

— resultados da autópsia;

— descrição pormenorizada de todos os dados neurocomportamentais, neuropatológicos e neuroquímicos ou electrofisiológicos, caso estejam disponíveis;

— dados de absorção e metabolismo, caso estejam disponíveis;

— tratamento estatístico dos resultados, se apropriado.

Análise dos resultados:

— informação sobre a resposta à dosagem;

— relação entre quaisquer outros efeitos tóxicos de modo a tirar conclusões sobre o potencial neurotóxico da substância química de ensaio;

— nível sem efeito adverso observável.

Conclusões:

— aconselha-se a inclusão de uma declaração específica sobre a neurotoxicidade global da substância química de ensaio.

4. **REFERÊNCIAS**

(1) OECD Guidance Document on Neurotoxicity Testing Strategies and Test Methods. OECD, Paris (em preparação).

(2) Test Guideline for a Developmental Neurotoxicity Study, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals (em Teratology).

(3) World Health Organisation (WHO) (1986) Environmental Health Criteria document 60: Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity associated with Exposure to Chemicals.

(4) Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H., (1980) Experimental and Clinical Neurotoxicology. Eds. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. eds. Williams and Wilkins, Baltimore/London.

▼B

(5) Tupper, D.E. and Wallace, R.B., (1980) Utility of the Neurological Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp., 40, p. 999-1003.

(6) Gad, S.C., (1982) A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol. Environ. Health, 9, p. 691-704.

(7) Moser, V.C., McDaniel, K.M. and Phillips, P.M., (1991) Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of amitraz. Toxic. Appl. Pharmacol., 108, p. 267-283.

(8) Meyer, O.A., Tilson, H.A., Byrd, W.C. and Riley, M.T., (1979) A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind- limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol., 1, p. 233-236.

(9) Crofton, K.M., Haward, J.L., Moser, V.C., Gill, M.W., Reirer, L.W., Tilson, H.A. and MacPhail, R.C., (1991) Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13, p. 599-609.

(10) Tilson, H.A., and Mitchell, C.L. eds., (1992) Neurotoxicology Target Organ Toxicology Series. Raven Press, New York.

(11) Chang, L.W., ed., (1995) Principles of Neurotoxicology. Marcel Dekker, New York.

(12) Broxup, B., (1991) Neuopathology as a screen for Neurotoxicity Assessment. J. Amer. Coll. Toxicol., 10, p. 689-695.

(13) Moser, V.C., Anthony, D.C., Sette, W.F. and MacPhail, R.C., (1992) Comparison of Subchronic Neurotoxicity of 2-Hydroxyethyl Acrylate and Acrylamide in Rats. Fund. Appl.Toxicol., 18, p. 343-352.

(14) O'Callaghan, J.P., (1988) Neurotypic and Gliotypic Proteins as Biochemical Markers of Neurotoxicity. Eurotoxicol. Teratol., 10, p. 445-452.

(15) O'Callaghan J.P. and Miller, D.B., (1988) Acute Exposure of the Neonatal Rat to Triethyltin Results in Persistent Changes in Neurotypic and Gliotypic Proteins. J. Pharmacol. Exp. Ther., 244, p. 368-378.

(16) Fox. D.A., Lowndes, H.E. and Birkamper, G.G., (1982) Electrophysiological Techniques in Neurotoxicology. In: Nervous System Toxicology. Mitchell, C.L. ed. Raven Press, New York, p. 299-335.

(17) Johnson, B.L., (1980) Electrophysiological Methods in neurotoxicity Testing. In: Experimental and Clinical Neurotoxicology. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. eds., Williams and Wilkins Co., Baltimore/London, p. 726-742.

(18) Bancroft, J.D. and Steven A., (1990) Theory and Pratice of Histological Techniques. Chapter 17, Neuropathological Techniques. Lowe, James and Cox, Gordon eds. Churchill Livingstone.

▼B

Tabela 1

Número mínimo de animais necessários, em cada grupo, para se realizar o ensaio de neurotoxicidade de forma independente ou em conjunto com outros estudos

	MODO DE REALIZAÇÃO DO ESTUDO DE TOXICIDADE			
	Estudo independente	Em combinação com o estudo de 28 dias	Em combinação com o estudo de 90 dias	Em combinação com o estudo de toxicidade crónica
Número total de animais por grupo	10 machos e 10 fêmeas	10 machos e 10 fêmeas	15 machos e 15 fêmeas	25 machos e 25 fêmeas
Número de animais escolhidos para ensaios funcionais, incluindo observações clínicas pormenorizadas	10 machos e 10 fêmeas	10 machos e 10 fêmeas	10 machos e 10 fêmeas	10 machos e 10 fêmeas
Número de animais escolhidos para perfusão *in situ* e neuro-histopatologia	5 machos e 5 fêmeas	5 machos e 5 fêmeas	5 machos e 5 fêmeas	5 machos e 5 fêmeas
Número de animais escolhidos para observações de toxicidade crónica, subcrónica ou relativa à dose, análises clínicas (hemograma, química clínica), histopatologia, etc., tal como descrito nas respectivas *Orientações*		5 machos e 5 fêmeas	10 machos † e 10 fêmeas †	20 machos † e 20 fêmeas †
Observações complementares, se apropriado	5 machos e 5 fêmeas			

† Inclui cinco animais escolhidos para ensaios funcionais e observações clínicas pormenorizadas como parte integrante do estudo de neurotoxicidade.

▼B

Tabela 2

Frequência das observações clínicas e dos ensaios funcionais

Tipo de observações		Duração do estudo			
		Aguda	28 dias	90 dias	Crónica
Em todos os animais	Estado geral de saúde	diária	diária	diária	diária
	Mortalidade/morbilidade	duas vezes ao dia	duas vezes ao dia	duas vezes ao dia	duas vezes ao dia
Nos animais escolhidos para as observações funcionais	Observações clínicas pormenorizadas	— antes do início do estudo — após 8 horas da administração da dose, no momento em que se espera uma resposta máxima — nos dias 7 e 14 após a administração da dose	— antes do início do estudo — uma vez por semana, daí em diante	— antes do início do estudo — uma vez, durante a primeira ou segunda semana, após o início do ensaio — uma vez por mês, daí em diante	— antes do início do estudo — uma vez decorrido um mês após o início do ensaio — de três em três meses, daí em diante
	Ensaios funcionais	— antes do início do estudo — após 8 horas da administração da dose, no momento em que se espera uma resposta máxima — nos dias 7 e 14 após a administração da dose	— antes do início do estudo — durante a quarta semana de tratamento e tão próximo quanto possível do final do período de ensaio	— antes do início do estudo — uma vez, durante a primeira ou segunda semana, após o início do ensaio — uma vez por mês, daí em diante	— antes do início do estudo — uma vez decorrido um mês após o início do ensaio — de três em três meses, daí em diante

▼B

B.44. ABSORÇÃO CUTÂNEA: MÉTODO *IN VIVO*

1. MÉTODO

O presente método de ensaio é equivalente ao método OECD TG 427 (2004).

1.1. INTRODUÇÃO

Embora a exposição a numerosas substâncias químicas envolva sobretudo a pele, na maior parte dos estudos toxicológicos em animais de laboratório é utilizada a via de administração oral. O estudo de absorção percutânea *in vivo* a que se refere o presente método constitui o elo necessário para a extrapolação dos resultados de estudos orais para a avaliação da inocuidade em caso de exposição cutânea.

Para atingir a corrente sanguínea, uma substância tem que atravessar numerosas camadas celulares da pele. A camada limitante da velocidade de penetração é o estrato córneo, constituído por células mortas. A permeabilidade da pele depende da lipofilia da substância química e da espessura da camada externa da epiderme, e ainda de outros factores, como o peso molecular e a concentração da substância. A pele dos ratos e dos coelhos é, em geral, mais permeável do que a do homem, ao passo que a permeabilidade da pele das cobaias e dos macacos se assemelha mais à da pele humana.

Os métodos de medição da absorção percutânea podem ser divididos em duas categorias: *in vivo* e *in vitro*. O método *in vivo* permite obter informações fiáveis sobre a absorção cutânea em várias espécies de laboratório. Mais recentemente foram desenvolvidos métodos *in vitro* baseados no transporte através de pele total ou de pele de clivagem, humana ou de animais, para um reservatório de fluido. O método *in vitro* encontra-se descrito num método de ensaio distinto (1). Na escolha do método mais apropriado para determinada situação recomenda-se a consulta do documento de orientação da OCDE para a realização de ensaios de absorção cutânea (2), no qual é tratada em mais pormenor a utilidade dos métodos *in vivo* e *in vitro*.

O método *in vivo* aqui descrito permite determinar a penetração da substância ensaiada no compartimento sistémico através da pele. A técnica tem sido amplamente utilizada desde há muitos anos (3) (4) (5) (6) (7). Embora os estudos de absorção percutânea *in vitro* sejam muitas vezes adequados, pode haver situações em que só um estudo *in vivo* permitirá obter os dados necessários.

As vantagens do método *in vivo* são a utilização de um sistema fisiológica e metabolicamente intacto, o uso da mesma espécie em muitos estudos de toxicidade e a possibilidade de adaptação para utilização com outras espécies. As desvantagens são a utilização de animais vivos, a necessidade de marcadores radioactivos para facilitar a obtenção de resultados fiáveis, a dificuldade de determinação da fase inicial da absorção e as diferenças de permeabilidade cutânea entre a espécie mais utilizada (rato) e o homem. A pele dos animais é normalmente mais permeável, o que pode levar a sobrestimar a absorção percutânea no homem (6) (8) (9). As substâncias cáusticas ou corrosivas não devem ser ensaiadas em animais vivos.

▼B

1.2. DEFINIÇÕES

Dose não absorvida: a que é removida da superfície cutânea após a exposição, por lavagem, ou que esteja eventualmente presente na cobertura não oclusiva, incluindo a que eventualmente se demonstre ter-se volatilizado da pele durante a exposição.

Dose absorvida (*in vivo*): inclui a que está presente na urina, nos resíduos de lavagem das gaiolas, nas fezes, no ar expirado (se tiver sido determinada), no sangue, nos tecidos (caso se proceda à sua colheita) e no resto da carcaça, uma vez retirada a pele do local de aplicação.

Dose absorvível: a que permanece na pele, ou à superfície desta, após a lavagem.

1.3. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

A substância a ensaiar, de preferência marcada com um radioisótopo, é aplicada na pele tosquiada em dose(s) adequada(s) na forma de uma preparação representativa, tal como é normalmente utilizada. A preparação ensaiada é deixada em contacto com a pele durante um período determinado, coberta de forma adequada (não oclusiva, semioclusiva ou oclusiva) para evitar que seja ingerida. Terminado o tempo de exposição, a pele é descoberta e limpa com um agente de limpeza adequado, conservando-se para análise a cobertura e os materiais utilizados na limpeza e tornando a aplicar-se uma cobertura limpa. Antes, durante e após o período de exposição, os animais são alojados em gaiolas de metabolismo individuais, devendo as excreções e o ar expirado durante esse período ser recolhidos para análise. A recolha do ar expirado pode ser omitida se os dados existentes permitirem concluir que a formação de metabolito radioactivo volátil é reduzida ou nula. Em cada estudo, vários grupos de animais serão normalmente expostos à preparação ensaiada. Um dos grupos será sacrificado no final do período de exposição. Os restantes grupos serão sacrificados posteriormente, a intervalos predeterminados (2). No final do período de amostragem, os animais restantes são sacrificados, procedendo-se à colheita de sangue e remoção do local de aplicação, para análise, e à pesquisa de material não excretado na carcaça. Após análise das amostras por meios adequados é feita a estimativa do grau de absorção cutânea (6) (8) (9).

1.4. DESCRIÇÃO DO MÉTODO

1.4.1. **Escolha da espécie animal**

O rato é a espécie mais utilizada, mas podem igualmente usar-se estirpes glabras e espécies com taxas de absorção cutânea mais semelhantes às do homem (3) (6) (7) (8) (9). Devem utilizar-se adultos saudáveis, todos do mesmo sexo (por defeito, machos), das estirpes correntemente utilizadas em laboratório. No início do estudo, a variação no peso dos animais não deve exceder ± 20 % do peso médio. Podem utilizar-se, por exemplo, ratos machos de 200 g a 250 g, sobretudo aqueles cujo peso se situe na metade superior deste intervalo.

▼B

1.4.2. **Número e sexo dos animais**

Deve utilizar-se um grupo de pelo menos quatro animais, todos do mesmo sexo, por cada preparação ensaiada e por cada um dos pontos terminais previstos. Cada grupo de animais será sacrificado após um intervalo diferente, por exemplo, no termo do período de exposição (geralmente, 6 ou 24 horas) e de subsequentes períodos equivalentes (48 e 72 horas, por exemplo). Caso existam dados comprovativos de diferenças substanciais entre machos e fêmeas, no que diz respeito à toxicidade cutânea, deve escolher-se o sexo mais sensível. Caso não existam tais dados, pode ser utilizado qualquer um dos sexos.

1.4.3. **Condições de alojamento e alimentação**

A temperatura do compartimento experimental dos animais deve ser de 22 °C (± 3 °C). A humidade relativa deverá ser de 50 %-60 %, embora sejam aceitáveis valores entre um mínimo de 30 % e um máximo que, preferivelmente, não deverá exceder 70 %, salvo durante os períodos de limpeza do compartimento. A iluminação deve ser artificial, com sequências de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão. A alimentação, que deve ser fornecida sem restrições, pode basear-se em dietas de laboratório convencionais, com fornecimento ilimitado de água para beber. Durante o estudo e, de preferência, também durante a aclimatação, os animais serão alojados em gaiolas de metabolismo individuais. Uma vez que o derrame de alimentos e água pode comprometer os resultados do estudo, é conveniente reduzir ao mínimo a probabilidade da sua ocorrência.

1.4.4. **Preparação dos animais**

Os animais são marcados de forma a poderem ser identificados individualmente e mantidos nas gaiolas pelo menos nos cinco dias anteriores ao início do estudo, para se aclimatarem às condições do laboratório.

Após o período de aclimatação, e cerca de 24 horas antes da administração, os animais serão tosquiados na região dos ombros e do dorso. Uma vez que as propriedades de permeação da pele lesada e da pele intacta são diferentes, deve tomar-se cuidado para não lesar a pele. Após a tosquia, e cerca de 24 horas antes de aplicar a substância a ensaiar (ver ponto 1.4.7), a superfície da pele deve ser limpa com acetona, para retirar o sebo. Não é aconselhável lavar novamente com água e sabão, já que quaisquer resíduos de sabão poderão favorecer a absorção da substância ensaiada. A área deve ser suficiente para permitir uma estimativa fiável da quantidade de substância ensaiada que é absorvida por cm^2 de pele — de preferência, 10 cm^2, pelo menos, o que é praticável em ratos com peso vivo entre 200 e 250 g. Após a preparação, os animais voltam a ser colocados nas gaiolas de metabolismo.

1.4.5. **Substância a ensaiar**

A substância a ensaiar é a entidade de que se pretendem estudar as propriedades de penetração. De preferência, a substância a ensaiar deve ser marcada com um radioisótopo.

1.4.6. **Preparação a ensaiar**

A preparação com a substância a ensaiar (por exemplo, material puro, diluído ou formulado contendo a substância a ensaiar e que se aplica na pele) deve ser aquela a que poderão estar expostos o homem ou outras espécies potencialmente visadas, ou um substituinte realista da mesma. Qualquer mudança em relação à preparação tal como é utilizada deve ser justificada. Se for necessário, a substância a ensaiar pode ser dissolvida ou suspensa num excipiente apropriado. As características de absorção dos excipientes — excepto a água — e a sua eventual interacção com a substância ensaiada devem ser conhecidos.

▼B

1.4.7. **Aplicação na pele**

Definir na superfície da pele um local de aplicação com uma área determinada. Aplicar em seguida nesse local, uniformemente, uma quantidade conhecida da preparação a ensaiar. Normalmente, a quantidade aplicada deve simular a exposição humana potencial, geralmente 1-5 mg/cm^2 para os sólidos e 10 µl/cm^2 para os líquidos. A utilização de outras quantidades deve ser justificada com base nas condições de utilização previstas, nos objectivos do estudo ou nas características físicas da preparação a ensaiar. Após a aplicação, o sítio tratado deve ser protegido, de forma a impedir que o animal se limpe. A figura 1 mostra um exemplo de dispositivo típico. O local de aplicação é normalmente protegido por uma cobertura não oclusiva (gaze de nylon permeável, por exemplo). Contudo, para aplicações infinitas, a cobertura do local de aplicação deve ser oclusiva. Em caso de ensaio de substâncias semivoláteis é necessário, se a evaporação provocar uma diminuição inaceitável da taxa de recuperação da substância ensaiada (ver também o primeiro parágrafo do ponto 1.4.10), captar a substância evaporada num filtro de carvão que cubra o dispositivo de aplicação (ver figura 1). É importante que o dispositivo não danifique a pele, nem absorva a preparação ensaiada ou reaja com ela. Os animais são depois novamente colocados nas gaiolas de metabolismo individuais, para recolha das excreções.

1.4.8. **Duração da exposição e da amostragem**

A duração da exposição é o tempo que decorre entre a aplicação e a remoção da preparação ensaiada por lavagem da pele. O período de exposição utilizado (geralmente, 6 ou 24 horas) deve ser adequado à duração provável da exposição humana. Terminado o período de exposição, os animais são mantidos nas gaiolas de metabolismo até ao termo previsto do ensaio. Os animais devem ser observados regularmente durante toda a duração do estudo, para detecção de sinais de toxicidade ou de reacções anormais. No final do período de exposição, a pele tratada deve ser observada para detecção de sinais visíveis de irritação.

As gaiolas de metabolismo devem permitir a recolha individual da urina e das fezes durante todo o estudo. É também conveniente que possibilitem a recolha do dióxido de carbono e compostos voláteis marcados com ^{14}C, que devem ser analisados caso sejam produzidos em quantidade (> 5 %). A urina, as fezes e os fluidos captados (dióxido de carbono e compostos de carbono voláteis marcados com ^{14}C, por exemplo) devem ser recolhidos individualmente em cada grupo, aquando de cada amostragem. Se os dados existentes permitirem concluir que a formação de metabolito radioactivo é reduzida ou nula podem ser utilizadas gaiolas abertas.

As excreções são recolhidas durante o período de exposição, até 24 horas após o contacto inicial com a pele e, em seguida, diariamente até ao final da experiência. Embora três intervalos de recolha de excreções sejam normalmente suficientes, pode ser conveniente dispor de pontos experimentais mais adequados, ou mais numerosos, atendendo à finalidade a que se destina a preparação ensaiada ou aos dados cinéticos existentes.

No final do período de exposição, o dispositivo de protecção de cada animal é retirado e conservado separadamente, para análise. Em todos os animais, a pele tratada deve ser lavada pelo menos três vezes com um agente de limpeza, utilizando zaragatoas apropriadas. Deve ter-se cuidado para evitar contaminar outras partes do corpo. O agente de limpeza deve ser representativo das práticas usuais de higiene — uma solução aquosa de sabão, por exemplo. Por fim, a pele deve ser enxugada. Todas as zaragatoas e resíduos da lavagem devem ser conservados para análise. Nos animais dos grupos correspondentes aos pontos experimentais mais tardios, o sítio tratado deve, antes do regresso às gaiolas individuais, tornar a ser protegido com uma cobertura limpa.

▼B

1.4.9. **Procedimentos finais**

Em cada grupo, os animais devem ser sacrificados no momento previsto, procedendo-se à colheita de sangue para análise. A cobertura de protecção deve ser retirada para análise. A pele do local de aplicação, bem como uma área semelhante de pele tosquiada não tratada, devem ser removidas de cada animal para serem analisadas separadamente. A pele do local de aplicação pode ser clivada, para separar o estrato córneo da epiderme subjacente, a fim de se obterem mais informações sobre a distribuição da substância em estudo. A determinação da evolução desta distribuição ao longo do tempo, após o período de exposição, deveria dar alguma indicação quanto ao destino da substância química em estudo eventualmente presente no estrato córneo. Para facilitar a clivagem da pele (após a lavagem final da pele e o sacrifício do animal), a cobertura de protecção é removida. A pele do local de aplicação, incluindo a coroa circular circundante, é excisada do rato e fixada com alfinetes numa placa. Aplicar uma fita adesiva sobre a pele, pressionando suavemente, e retirar a fita adesiva, que trará consigo parte do estrato córneo. Repetir o processo com novas fitas adesivas até ao momento em que, uma vez removido inteiramente o estrato córneo, a fita deixa de aderir à pele. Todas as fitas adesivas utilizadas para cada animal podem ser depositadas no mesmo recipiente, adicionando-se-lhes em seguida um digestor de tecidos para solubilização do estrato córneo. Os tecidos-alvo potenciais podem ser removidos para medições separadas, antes da análise do resto da carcaça para determinação da dose absorvida na carcaça. As carcaças dos animais devem ser conservadas individualmente para análise. A análise do teor total será, normalmente, suficiente. Os órgãos-alvo podem ser retirados para serem analisados individualmente (se outros estudos assim o indicarem). A urina presente na bexiga aquando do sacrifício programado deve ser adicionada à urina recolhida anteriormente. Após a recolha das excreções presentes nas gaiolas de metabolismo no momento do sacrifício programado, as gaiolas e os sistemas de captação devem ser lavados com um solvente adequado. O restante equipamento potencialmente contaminado deve também ser analisado.

1.4.10. **Análise**

Em todos os estudos, deve obter-se uma taxa de recuperação adequada (a média a obter será de 100 ± 10 % da radioactividade). Taxas de recuperação fora desse intervalo devem ser justificadas. A quantidade da dose administrada presente em cada amostra deve ser determinada por processos devidamente validados.

A análise estatística deve incluir a determinação da variância para as repetições de cada aplicação.

2. **DADOS**

Em relação a cada animal, e em cada amostragem para pesquisa da substância ensaiada ou dos seus metabolitos, devem ser feitas as seguintes determinações (além de serem apresentados individualmente, os dados devem também ser agrupados por tempos de amostragem e apresentados sob forma de médias):

— quantidade associada aos dispositivos de protecção,

— quantidade que pode ser retirada da pele,

— quantidade presente na pele que não pode ser removida por lavagem,

▼B

— quantidade presente no sangue colhido,

— quantidade presente nas excreções e no ar expirado (se for caso disso),

— quantidade restante na carcaça e em órgãos eventualmente retirados para serem analisados separadamente.

Com base na quantidade de substância ensaiada e/ou dos seus metabolitos nas excreções, no ar expirado, no sangue e na carcaça poder-se-á determinar a quantidade total absorvida em cada um dos pontos experimentais. Pode também ser calculada a quantidade de substância ensaiada que foi absorvida por cm^2 de pele exposta, ao longo do período de exposição.

3. **RELATÓRIOS**

3.1. RELATÓRIO DO ENSAIO

O relatório do ensaio deve incluir os requisitos especificados no protocolo, nomeadamente a justificação da escolha do sistema experimental utilizado, devendo conter os seguintes elementos:

Substância ensaiada:

— dados relativos à identificação [número CAS, se existir; proveniência; pureza (pureza radioquímica); impurezas conhecidas; número do lote; etc.],

— natureza física, propriedades físico-químicas (por exemplo, pH, volatilidade, solubilidade, estabilidade, peso molecular e log P_{oa}).

Preparação ensaiada:

— formulação e justificação da utilização,

— informações sobre a preparação ensaiada, quantidade aplicada, concentração atingida, excipiente, estabilidade e homogeneidade.

Animais experimentais:

— espécie/estirpe usada;

— número, idade e sexo dos animais;

— proveniência, condições de alojamento, dieta, etc.,

— peso de cada animal no início do ensaio.

Condições experimentais:

— informações relativas à administração da preparação ensaiada (local de aplicação, métodos de determinação, oclusão ou não, volume, extracção, detecção),

— informações sobre a qualidade dos alimentos e da água.

Resultados:

— quaisquer sinais de toxicidade,

— quadro dos valores de absorção (expressos em taxa, quantidade ou percentagem),

▼B

— taxas de recuperação globais do ensaio,

— interpretação dos resultados, comparação com dados eventualmente existentes sobre a absorção percutânea do composto ensaiado.

Discussão dos resultados.

Conclusões.

4. **REFERÊNCIAS**

(1) Método de ensaio B.45. Absorção cutânea: método *in vitro*.

(2) OECD (2002). Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD, Paris.

(3) ECETOC, (1993) Percutaneous Absorption. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, Monograph No 20.

(4) Zendzian, R.P., (1989) Skin Penetration Method suggested for Environmental Protection Agency Requirements. *J. Am. Coll. Toxicol*. 8(5), p. 829-835.

(5) Kemppainen, B.W., Reifenrath WG (1990) Methods for skin absorption. CRC Press Boca Raton, FL, USA.

(6) EPA, (1992) Dermal Exposure Assessment: Principles and Applications. Exposure Assessment Group, Office of Health and Environmental Assessment.

(7) EPA, (1998) Health Effects Test Guidelines, OPPTS 870-7600, Dermal Penetration. Office of Prevention, Pedsticides and Toxic Substances.

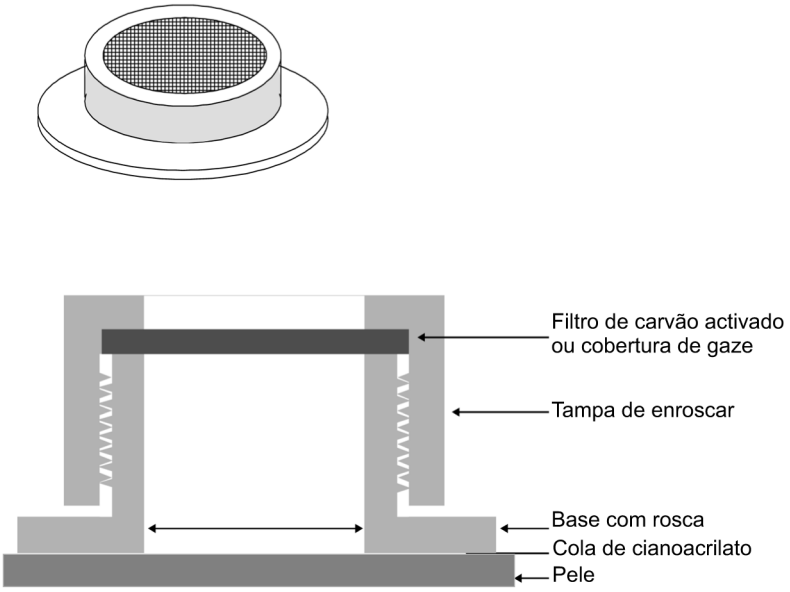
(8) Bronaugh, R.L., Wester, R.C., Bucks, D., Maibach H.I. and Sarason, R., (1990) *In vivo* percutaneous absorption of fragrance ingredients in reshus monkeys and humans. *Fd. Chem. Toxic*. 28, p. 369-373.

(9) Feldman, R.J. and Maibach, H.I., (1970) Absorption of some organic compounds through the skin in man. *J. Invest Dermatol*. 54, p. 399-404.

▼B

Figura 1

Exemplo de esquema de dispositivo tipicamente utilizado para definir e proteger o local de aplicação cutânea nos estudos de absorção percutânea *in vivo*



▼B

B.45. ABSORÇÃO CUTÂNEA: MÉTODO *IN VITRO*

1. MÉTODO

O presente método de ensaio é equivalente ao método OECD TG 428 (2004).

1.1. INTRODUÇÃO

O presente método foi concebido para a obtenção de informações sobre a absorção de uma substância a ensaiar quando aplicada em pele excisada; pode ser combinado com o «Método de absorção cutânea: método *in vivo*» (1) ou utilizado separadamente. No delineamento de estudos baseados no presente método, recomenda-se a consulta do documento de orientação da OCDE para a realização de ensaios de absorção cutânea (2). O referido documento de orientação foi elaborado no intuito de facilitar a escolha de processos *in vitro* adequados para utilização em circunstâncias específicas, de forma a garantir a fiabilidade dos resultados obtidos pelo presente método.

Os métodos de medição da absorção cutânea e da transferência através da pele podem dividir-se em duas categorias: *in vivo* e *in vitro*. Os métodos de absorção cutânea *in vivo* estão já consagrados, permitindo obter dados farmacocinéticos em diversas espécies animais. Num método de ensaio distinto (1) é feita a descrição de um método *in vivo*. Os métodos *in vitro* são também utilizados há muitos anos para medir a absorção cutânea. Embora não tenham sido efectuados estudos de validação formal dos métodos *in vitro* abrangidos pelo presente método de ensaio, os peritos da OCDE acordaram em 1999 em que os dados avaliados existentes eram suficientes para apoiar o método *in vitro* (3). No documento de orientação (2) são fornecidos elementos comprovativos adicionais, incluindo diversas comparações directas de métodos *in vitro* e *in vivo*. O assunto foi também tratado em diversas monografias, que contêm informações básicas pormenorizadas sobre o uso de um método *in vitro* (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12). Os métodos *in vitro* medem a difusão de substâncias químicas para a pele e, através desta, para um reservatório de fluido, podendo ser utilizada pele não viável, apenas para medir a difusão, ou pele fresca, metabolicamente activa, para medir simultaneamente a difusão e o metabolismo cutâneo. Estes métodos revelaram-se muito úteis na triagem de diferentes formulações quanto à sua utilidade na transferência de substâncias químicas para a pele e através dela, podendo também constituir modelos úteis na avaliação da absorção percutânea no homem.

O método *in vitro* pode não ser aplicável em todas as situações e a todos os tipos de substâncias químicas. Por vezes pode utilizar-se o método de ensaio *in vitro* para uma avaliação qualitativa inicial da penetração cutânea. Em certos casos, poderá ser necessário completar esta avaliação com dados *in vivo*. Para mais pormenores sobre as situações em que a utilização do método *in vitro* poderá ser adequada, consultar o documento de orientação (2). A referência (3) contém informações pormenorizadas adicionais de apoio à decisão.

No presente método são apresentados os princípios gerais em que assenta a medição da absorção cutânea e subsequente transferência através da pele de uma substância a ensaiar, utilizando pele excisada. Pode ser utilizada pele de muitas espécies de mamíferos, incluindo o homem. As propriedades de permeabilidade da pele mantêm-se após a excisão, porque o principal obstáculo à difusão é o estrato córneo não viável, não tendo sido detectado o transporte percutâneo activo de substâncias químicas. Apesar de ter sido demonstrado que a pele é capaz de metabolizar algumas substâncias durante a absorção percutânea (6), trata-se de um processo que não é limitante em termos de dose efectivamente absorvida, embora possa afectar a natureza das substâncias introduzidas na corrente sanguínea.

▼B

1.2. DEFINIÇÕES

Dose não absorvida: a que é removida da superfície cutânea após a exposição, por lavagem, ou que esteja eventualmente presente na cobertura não oclusiva, incluindo a que eventualmente se demonstre ter-se volatilizado da pele durante a exposição.

Dose absorvida (*in vitro*): massa de substância a ensaiar que atinge o fluido receptor ou a circulação sistémica num período especificado.

Dose absorvível (*in vitro*): a que permanece na pele, ou à superfície desta, após a lavagem.

1.3. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

A substância a ensaiar, que pode ser marcada com um radioisótopo, é aplicada na superfície de uma amostra de pele que separa as duas câmaras de uma célula de difusão. A substância química permanece sobre a pele por um período e em condições especificados, antes de ser retirada por um processo de limpeza adequado. A intervalos determinados ao longo da experiência colhem-se amostras do fluido receptor, que são depois analisadas para detecção da substância a ensaiar e/ou dos seus metabolitos.

Caso se utilizem sistemas metabolicamente activos, os metabolitos da substância a ensaiar podem ser analisados por métodos adequados. No final da experiência quantifica-se, se for caso disso, a distribuição da substância a ensaiar e dos seus metabolitos.

Utilizando condições adequadas, descritas no presente método e no documento de orientação (2), a absorção durante determinado período da substância ensaiada é medida por análise do fluido receptor e da pele tratada. A substância ensaiada que permanece na pele deve ser considerada como absorvida, excepto se for possível demonstrar que a absorção pode ser determinada com base apenas nos valores relativos ao fluido receptor. A análise dos outros elementos (material removido da pele por lavagem, ou que permanece nas camadas da pele) permite uma avaliação complementar dos resultados, nomeadamente por determinação da distribuição total da substância ensaiada e da taxa de recuperação.

Os resultados obtidos com substâncias de referência pertinentes devem encontrar-se disponíveis e estar em conformidade com a bibliografia relativa ao método utilizado, a fim de demonstrar a eficiência e fiabilidade do sistema de ensaio no laboratório executante. Para o preenchimento desta condição pode ser efectuado concomitantemente o ensaio de uma substância de referência adequada (de preferência, com uma lipofilia próxima da da substância em ensaio) e da substância a ensaiar, ou ser fornecidos dados anteriores adequados para várias substâncias de referência de lipofilias diferentes (por exemplo, cafeína, ácido benzóico e testosterona).

1.4. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.4.1. **Célula de difusão**

Uma célula de difusão é constituída por uma câmara dadora e uma câmara receptora, estando a pele colocada entre as duas câmaras (na figura 1 apresenta-se um exemplo de esquema típico deste dispositivo). A célula deve garantir uma boa vedação em torno da pele e permitir uma amostragem fácil e uma mistura eficaz da solução receptora em contacto com a face interna da pele, e um bom controlo da temperatura da célula e do seu conteúdo. Podem ser utilizadas células de difusão estáticas ou de fluxo. Normalmente, o compartimento dador é deixado descoberto durante a exposição a uma dose finita da preparação a ensaiar. Contudo, para aplicações infinitas e em certos casos de aplicações finitas, as câmaras dadoras podem ser fechadas.

▼B

1.4.2. **Fluido receptor**

É preferível a utilização de um fluido receptor fisiologicamente compatível, embora possam também utilizar-se outros, desde que a sua utilização seja fundamentada. Deve ser dada a composição exacta do fluido receptor. Deve ser demonstrada a solubilidade adequada da substância a ensaiar no fluido receptor, de forma a que este não constitua um obstáculo à absorção. Além disso, o fluido receptor não deve afectar a integridade da preparação de pele. Num sistema de fluxo, o débito não deve dificultar a difusão da substância a ensaiar no fluido receptor. Num sistema de célula estática, o fluido deve ser agitado continuamente, devendo colher-se amostras a intervalos regulares. Caso esteja a ser estudado o metabolismo, o fluido receptor deve permitir manter a viabilidade da pele durante toda a experiência.

1.4.3. **Preparações de pele**

Pode ser utilizada pele de origem humana ou animal. Reconhece-se que a utilização de pele humana está sujeita a considerações e condições éticas nacionais e internacionais. Embora seja preferível pele viável, pode ser também utilizada pele não viável, desde que a sua integridade possa ser demonstrada. Podem utilizar-se membranas epidérmicas (separadas por métodos enzimáticos, térmicos ou químicos) ou pele de clivagem (geralmente com 200-400 μm de espessura) preparada com um dermátomo. Pode ser utilizada pele total, mas deve evitar-se uma espessura excessiva (superior a cerca de 1 mm), excepto quando seja especificamente exigida para a determinação da substância a ensaiar nas camadas da pele. A escolha da espécie, do local anatómico e da técnica de preparação deve ser justificada. Exigem-se dados aceitáveis de um mínimo de quatro repetições por preparação ensaiada.

1.4.4. **Integridade da preparação de pele**

É essencial que a pele seja convenientemente preparada. Um manuseio incorrecto pode danificar o estrato córneo, sendo necessário, por conseguinte, verificar a integridade da pele depois de preparada. Caso esteja em estudo o metabolismo cutâneo, a pele recém-excisada deve ser utilizada o mais depressa possível, em condições que permitam comprovadamente manter a actividade metabólica. A título de orientação, a pele recém-excisada deve em geral ser utilizada no prazo de 24 horas, embora o período de armazenagem aceitável varie em função do sistema enzimático que intervém na metabolização e das temperaturas de armazenagem (13). Caso as preparações de pele tenham estado armazenadas antes de serem utilizadas, deverão apresentar-se provas de que a função de barreira se mantém.

1.4.5. **Substância a ensaiar**

A substância a ensaiar é a entidade de que se pretendem estudar as propriedades de penetração. De preferência, a substância a ensaiar deve ser marcada com um radioisótopo.

1.4.6. **Preparação a ensaiar**

A preparação com a substância a ensaiar (por exemplo, material puro, diluído ou formulado contendo a substância a ensaiar e que se aplica na pele) deve ser aquela a que poderão estar expostos o homem ou outras espécies potencialmente visadas, ou um substituinte realista da mesma. Qualquer mudança relativamente à preparação tal como é utilizada deve ser justificada.

▼B

1.4.7. **Concentrações e formulações das substâncias a ensaiar**

Utilizam-se normalmente várias concentrações da substância a ensaiar, de forma a cobrir os valores mais elevados de exposição humana potencial. Da mesma maneira, deve ser considerado o ensaio de várias formulações típicas.

1.4.8. **Aplicação na pele**

Em condições normais, o homem é exposto a doses finitas de substâncias químicas. Deve utilizar-se, por conseguinte, uma aplicação que simule as condições de exposição do homem, ou seja, normalmente, de 1-5 mg/cm^2 de pele para os sólidos e de até 10 $\mu l/cm^2$ para os líquidos. A quantidade deve ser justificada com base nas condições de utilização previstas, nos objectivos do estudo ou nas características da preparação a ensaiar. Por exemplo, com a aplicação de grandes volumes por unidade de superfície as aplicações à superfície da pele podem ser infinitas.

1.4.9. **Temperatura**

A temperatura afecta a difusão passiva das substâncias químicas — e também, por conseguinte, a sua absorção pela pele. A câmara de difusão e a pele devem ser mantidas a temperatura constante, próxima da temperatura normal da pele, de 32 +/-1^oC. A temperatura do banho-maria ou da manta de aquecimento que é necessária para manter o fluido receptor e a pele à temperatura fisiológica dependerá da concepção da célula. A humidade deve, de preferência, ser mantida entre 30 % e 70 %.

1.4.10. **Duração da exposição e da amostragem**

A exposição da pele à preparação a ensaiar pode manter-se durante todo o ensaio ou limitar-se a períodos mais curtos (para simular um tipo específico de exposição do homem). A lavagem da pele para remover o excesso de preparação a ensaiar deve ser feita com um agente de limpeza adequado, recolhendo-se o líquido de lavagem para análise. A forma de retirar a preparação a ensaiar dependerá das condições de utilização previstas, e deve ser justificada. O período de amostragem exigido é normalmente de 24 h, período que permite caracterizar convenientemente o perfil de absorção. Uma vez que a integridade da pele pode começar a deteriorar-se uma vez excedidas 24 horas, a colheita de amostras não deve normalmente prolongar-se para além deste prazo. Para substâncias de rápida penetração cutânea, esse período pode não ser necessário, mas para substâncias de penetração lenta podem ser necessários períodos mais longos. A frequência de amostragem do fluido receptor deve permitir a representação gráfica do perfil de absorção da substância a ensaiar.

1.4.11. **Procedimentos finais**

Todos os componentes do sistema de ensaio devem ser analisados, devendo determinar-se a taxa de recuperação. Os componentes incluem a câmara dadora, o líquido de lavagem superficial da pele, a preparação de pele, o fluido receptor e a respectiva câmara. Nalguns casos, a pele pode ser fraccionada em pele com a superfície exposta e pele sob a flange da célula, e em estrato córneo, epiderme e derme, analisando-se cada fracção separadamente.

1.4.12. **Análise**

Em todos os estudos, deve obter-se uma taxa de recuperação adequada (a média a obter será de 100 +/- 10 % da radioactividade, devendo os eventuais desvios ser justificados). A quantidade de substância a ensaiar presente no fluido receptor, na preparação de pele, no líquido de lavagem superficial da pele e no líquido de lavagem do aparelho deve ser determinada por método adequado.

▼B

2. **RESULTADOS**

Deve apresentar-se a análise do fluido receptor, a distribuição da substância química ensaiada no sistema de ensaio e a evolução da absorção ao longo do tempo. Caso sejam utilizadas condições de exposição a uma dose finita, deve ser calculada a quantidade removida da pele por lavagem, a quantidade associada à pele (e às suas diferentes camadas, caso sejam analisadas) e a quantidade presente no fluido receptor (taxa, e quantidade ou percentagem da dose aplicada). A absorção cutânea pode por vezes ser expressa utilizando apenas os dados do fluido receptor. Contudo, caso a substância ensaiada permaneça na pele no final do ensaio, pode ser necessário incluí-la na quantidade total absorvida [ver ponto 66 da referência (3)]. Quando se utilizem condições de exposição a uma dose infinita os dados podem permitir o cálculo de uma constante de permeabilidade (Kp). Nestas últimas condições, a percentagem absorvida é irrelevante.

3. **RELATÓRIOS**

3.1. RELATÓRIO DO ENSAIO

O relatório do ensaio deve incluir os requisitos especificados no protocolo, nomeadamente a justificação da escolha do sistema de ensaio utilizado, devendo conter os seguintes elementos:

Substância a ensaiar:

— natureza física, propriedades físico-químicas (pelo menos, peso molecular e log P_{oa}), pureza (pureza radioquímica),

— dados relativos à identificação (por exemplo, número do lote),

— solubilidade no fluido receptor.

Preparação a ensaiar:

— formulação e justificação da utilização,

— homogeneidade.

Condições do ensaio:

— origem e local de proveniência da pele, método de preparação, condições de armazenagem antes da utilização, eventuais pré-tratamentos (limpeza, tratamentos antibióticos, etc.), medições da integridade da pele, estado metabólico, justificação da utilização,

— concepção da célula, composição do fluido receptor, débito do fluido receptor ou intervalos e processos de amostragem,

— informações pormenorizadas quanto à aplicação da preparação a ensaiar e à quantificação da dose aplicada,

— duração da exposição,

— informações sobre a remoção da preparação a ensaiar da pele, por exemplo, por lavagem,

— informações sobre a análise da pele e as técnicas de clivagem eventualmente utilizadas na demonstração da distribuição cutânea,

▼B

— processos de lavagem da célula e do equipamento,

— métodos de determinação analítica, técnicas de extracção, limites de detecção e validação do método analítico.

Resultados:

— taxas de recuperação globais do ensaio (Dose aplicada = Líquido de lavagem da pele + Pele + Fluido receptor + Líquido de lavagem da célula),

— quadro das taxas de recuperação em cada compartimento da célula,

— perfil de absorção,

— quadro dos valores de absorção (expressos em taxa, quantidade ou percentagem).

Discussão dos resultados.

Conclusões.

4. **REFERÊNCIAS**

(1) Método de ensaio B.44. Absorção cutânea: Método *in vivo*.

(2) OECD, (2002) Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD, Paris.

(3) OECD, (2000) Report of the Meeting of the OECD Extended Steering Committee for Percutaneous Absorption Testing, Annex 1 to ENV/JM/TG(2000)5. OECD, Paris.

(4) Kemppainen B.W. and Reifenrath W.G., (1990) Methods for skin absorption. CRC Press, Boca Raton.

(5) Bronaugh R.L. and Collier, S.W., (1991) Protocol for *In vitro* Percutaneous Absorption Studies, in *In vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Application*s, RL Bronaugh and HI Maibach, Eds., CRC Press, Boca Raton, p. 237-241.

(6) Bronaugh, R.L. and Maibach H.I., (1991) *In vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Application*s. CRC Press, Boca Raton.

(7) European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, (1993) Monograph No 20, Percutaneous Absorption, ECETOC, Brussels.

(8) Diembeck, W., Beck, H., Benech-Kieffer, F., Courtellemont, P., Dupuis J, Lovell W, Paye M, Spengler J, Steiling W (1999). Test Guidelines for *In Vitro* Assessment of Dermal Absorption and Percutaneous Penetration of Cosmetic Ingredients, Fd Chem Tox, 37, p. 191-205.

(9) Recommended Protocol for *In vitro* Percutaneous Absorption Rate Studies (1996). US Federal Register, Vol. 61, No 65.

(10) Howes, D., Guy, R., Hadgraft, J., Heylings, J.R. et al. (1996). Methods for assessing Percutaneous absorption. ECVAM Workshop Report ATLA 24, 81 R10.

▼B

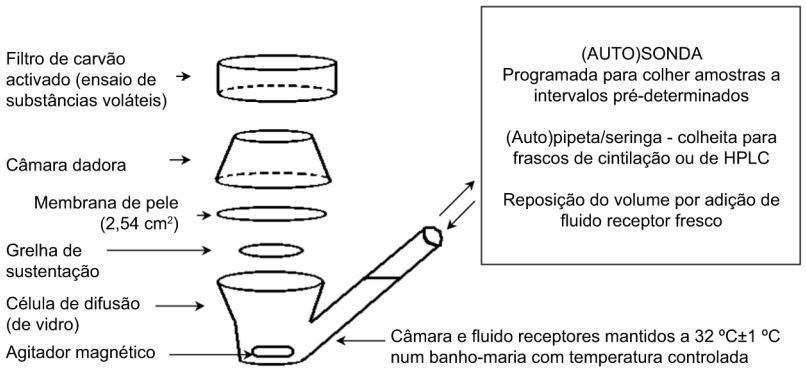
(11) Schaefer, H. and Redelmeier, T.E., (1996). Skin barrier: principles of percutaneous absorption. Karger, Basel.

(12) Roberts, M.S. and Walters, K.A., (1998). Dermal absorption and toxicity assessment. Marcel Dekker, New York.

(13) Jewell, C., Heylings, J.R., Clowes, H.M. and Williams, F.M. (2000). Percutaneous absorption and metabolism of dinitrochlorobenzene in vitro. Arch Toxicol 74, p. 356-365.

Figura 1

Exemplo de esquema típico de uma célula de difusão estática para estudos de absorção percutânea *in vitro*



▼M8

B.46. IRRITAÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO*: MÉTODO DE ENSAIO EM EPIDERME HUMANA RECONSTRUÍDA

INTRODUÇÃO

1. O presente método de ensaio é equivalente à *Test Guideline* (TG) 439 (2015) da OCDE. Entende-se por irritação cutânea a produção de danos reversíveis na pele por aplicação de um produto químico em estudo durante, no máximo, quatro horas [definição do Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos das Nações Unidas (ONU) (GHS) e do Regulamento (CE) n.º 1272/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16 de dezembro de 2008, relativo à classificação, rotulagem e embalagem de substâncias e misturas da União Europeia (UE) ([1]). O presente método de ensaio descreve um procedimento *in vitro* que pode ser utilizado para identificar os perigos associados a produtos químicos (substâncias e misturas) irritantes, da categoria 2 dos sistemas GHS da ONU e CRE da UE (2). Pode também ser utilizado para identificar produtos químicos não classificados nas regiões que não adotem a categoria 3 – facultativa – do sistema GHS da ONU (irritantes ligeiros). Assim, consoante o quadro regulamentar e o sistema de classificação utilizado, o presente método pode ser utilizado para determinar o poder de irritação cutânea dos produtos químicos, quer como ensaio independente alternativo de estudos de irritação cutânea *in vivo* ou como ensaio parcial alternativo no âmbito de uma estratégia de ensaio (3).

2. A determinação da irritação cutânea utiliza normalmente animais de laboratório [método de ensaio 4, equivalente à *Test Guideline* 404 da OCDE, adotada em 1981 e revista em 1992, 2002 e 2015] (4). Para o ensaio de corrosividade, foram adotados pela UE três métodos de ensaio *in vitro* validados, designadamente os métodos de ensaio B.40 (equivalente à *Test Guideline* 430 da OCDE), B.40-A (equivalente à *Test Guideline* 431 da OCDE) e B.65 (equivalente à *Test Guideline* 435 da OCDE) (5) (6) (7). Um documento de orientação da OCDE sobre abordagens integradas de ensaio e avaliação (IATA) para a corrosão e irritação da pele descreve vários módulos que agrupam diversas fontes de informação e instrumentos de análise e fornece orientações sobre (i) como integrar e utilizar os ensaios existentes e os dados não provenientes de ensaios para a avaliação dos potenciais de irritação e de corrosão cutâneas dos produtos químicos e (ii) propõe uma abordagem quando há necessidade de ensaios complementares (3).

3. O presente método de ensaio incide na irritação cutânea no ser humano. Baseia-se no sistema de ensaio *in vitro* de epiderme humana reconstruída, que reproduz com rigor as propriedades bioquímicas e fisiológicas das camadas superiores da pele humana, isto é, da epiderme. O sistema de ensaio de epiderme humana reconstruída utiliza queratinócitos humanos derivados, não transformados, como fonte de células para reconstruir um modelo epidérmico com histologia e citoarquitetura representativas. Existem normas de desempenho (ND) para facilitar a validação e a avaliação de métodos similares e modificados de ensaio de epiderme humana reconstruída, em conformidade com os princípios do documento de orientação 34 da OCDE (8) (9). A diretriz de ensaio correspondente foi adotada em 2010, atualizada em 2013 – a fim de incluir os modelos adicionais de epiderme humana reconstruída – e novamente atualizada em 2015, para ter em conta o documento de orientação da IATA e introduzir um procedimento alternativo para a determinação da viabilidade.

4. Foram realizados estudos de pré-validação, otimização e validação para quatro modelos de ensaio *in vitro* comercialmente disponíveis (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28)

([1]) Regulamento (CE) n.º 1272/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16 de dezembro de 2008, relativo à classificação, rotulagem e embalagem de substâncias e misturas, que altera e revoga as Diretivas 67/548/CEE e 1999/45/CE, e altera o Regulamento (CE) n.º 1907/2006 (JO L 353 de 31.12.2008).

▼M8

com base no sistema de ensaio de epiderme humana reconstruída (sensibilidade 80 %, especificidade 70 % e exatidão 75 %). Estes quatro modelos de ensaio estão incluídos no presente e constam da lista do apêndice 2, que também fornece informações sobre o tipo de estudo de validação utilizado para validar os respetivos métodos de ensaio. Conforme se indica no apêndice 2, utilizou-se o método de referência validado (MRV) para elaborar o presente método de ensaio e as normas de desempenho (8).

5. A aceitação mútua de dados nos termos do acordo da OCDE só poderá ser garantida no caso de métodos de ensaio validados de acordo com as normas de desempenho (8), se estes métodos tiverem sido analisados e adotados pela OCDE. Os modelos incluídos neste método de ensaio, bem como a correspondente *Test Guideline*, podem ser utilizados indiscriminadamente para satisfazer as necessidades dos países em matéria de ensaios com métodos *in vitro* de irritação cutânea, beneficiando simultaneamente da aceitação mútua de dados.

6. O apêndice 1 apresenta as definições dos termos utilizados no presente documento.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES

7. Uma das limitações do presente método de ensaio, comprovada por estudos prospetivos de validação que avaliam e caracterizam métodos de ensaio de epiderme humana reconstruída (16), reside no facto de não permitir a subcategorização de produtos químicos na categoria facultativa 3 (irritantes ligeiros) do GHS da ONU. Por conseguinte, o quadro regulamentar dos Estados-Membros decidirá o modo como será aplicado. No caso da UE, a categoria 3 não foi incluída no CRE. Para uma avaliação completa dos efeitos locais na pele após uma exposição única por via dérmica, deve consultar-se o documento de orientações da OCDE relativo a abordagens integradas de ensaio e avaliação da OCDE (3). É sabido que a utilização de pele humana está sujeita a condições e argumentos nacionais e internacionais de natureza ética.

8. O presente método de ensaio incide na irritação cutânea no ser humano; embora não forneça informações adequadas sobre a corrosão da pele, importa referir que o método de ensaio B.40-A (equivalente à *Test Guideline* 431 da OCDE), sobre a corrosão cutânea, se baseia no mesmo sistema de ensaio de epiderme humana reconstruída, embora utilize outro protocolo (6). O presente método baseia-se em modelos de epiderme humana reconstruída com queratinócitos humanos, o que representa, portanto, *in vitro,* o órgão-alvo da espécie em causa. O método cobre ainda, diretamente, a fase inicial do mecanismo de ação/o processo inflamatório (das células e dos tecidos, que originam traumatismos localizados) que ocorre na irritação *in vivo*. Durante a validação do método, ensaiou-se uma vasta gama de produtos químicos, contando a base de dados do estudo de validação com 58 produtos químicos (16) (18) (23). O método é aplicável a sólidos, líquidos, semissólidos e ceras. Os líquidos podem ser aquosos ou não e os sólidos podem ser solúveis ou insolúveis na água. Sempre que possível, os sólidos devem ser moídos em pó fino antes da aplicação; nenhum outro tratamento prévio da amostra é necessário. O estudo de validação ainda não incidiu em gases e aerossóis (29). Embora se possa considerar que estes podem ser ensaiados por recurso à tecnologia da epiderme humana reconstruída, o método de ensaio atual não permite o ensaio de gases e aerossóis.

9. Antes da aplicação do método de ensaio a uma mistura, para obter dados com fins normativos, importa ponderar se – e, em caso afirmativo, por que motivo – o método pode proporcionar resultados adequados para o efeito. Essas considerações não são necessárias se existir um requisito normativo

▼M8

para o ensaio da mistura. No entanto, uma vez que as misturas abrangem uma vasta gama de categorias e composições e que, na atualidade, se dispõe de informações limitadas sobre a análise das mesmas, nos casos em que puder ser demonstrada a inaplicabilidade do método de ensaio a uma categoria específica de misturas (por exemplo, na sequência de uma estratégia como a proposta por Eskes *et al.*, 2012) (18), o método não deve ser utilizado para essa categoria específica de misturas. Deve ter-se o mesmo cuidado caso se observem determinadas propriedades químicas ou físico-químicas específicas incompatíveis com o método de ensaio.

10. Os produtos químicos que absorvem luz na mesma gama que o MTT-formazano, bem como os produtos químicos em estudo capazes de reduzir diretamente o corante vital MTT (MTT-formazano), podem interferir nas determinações da viabilidade das células e requerer o recurso a controlos adaptados para correções (ver pontos 28 a 34).

11. Quando a classificação do produto químico em estudo é inequívoca, basta geralmente uma série de ensaios, constituída por um triplicado dos tecidos. Porém, nos casos inconclusivos (por exemplo, medições discordantes dos replicados e/ou percentagem de viabilidade média igual a 50 % ±5 %), é de ponderar a realização de uma segunda série de ensaios, bem como de uma terceira, se os resultados das duas primeiras forem discordantes.

PRINCÍPIO DO ENSAIO

12. O produto químico em estudo é aplicado localmente num modelo tridimensional de epiderme humana reconstruída, constituído por queratinócitos de epiderme humana não transformados, cultivados de modo a formarem um modelo de epiderme com várias camadas e altamente diferenciado. O modelo é constituído por uma camada basal, uma camada espinhosa e uma camada granulosa organizadas e por um *stratum corneum* em várias camadas, com uma estrutura lipídica lamelar intercelular representativa das principais classes de lípidos, semelhante ao observado *in vivo*.

13. A irritação cutânea induzida por produtos químicos, manifestada principalmente por eritema e edema, resulta de uma cascata de eventos que se inicia com a penetração das substâncias químicas através do *stratum corneum*, onde podem danificar as camadas subjacentes de queratinócitos e de outras células da pele. As células danificadas podem liberar mediadores inflamatórios ou induzir uma cascata inflamatória que também atua sobre as células da derme, particularmente o estroma e células endoteliais dos vasos sanguíneos. A dilatação e permeabilidade crescente das células endoteliais originam o eritema e o edema observados (29). Nomeadamente, os métodos de ensaios baseados na ausência de vascularização no sistema de ensaio *in vitro* avaliam os eventos que dão início à cascata – por exemplo, danos nas células/tecidos (16) (17) –, utilizando a viabilidade celular como leitura.

14. A viabilidade celular nos modelos de epiderme humana reconstruída é medida pela conversão enzimática do corante vital MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio, azul de tiazolilo, n.º CAS 298-93-1] num sal de azul de formazano, que é determinado quantitativamente depois de extraído dos tecidos (31). Os produtos químicos irritantes são identificados com base na sua capacidade de redução da viabilidade celular para valores inferiores a determinados limites (≤ 50 % no caso das substâncias irritantes classificadas na categoria 2 dos sistemas GHS da ONU e CRE da UE). Consoante o quadro regulamentar e a aplicabilidade do método de ensaio, os produtos químicos que produzam viabilidades celulares acima do limiar definido podem ser considerados não irritantes (> 50 %, sem categoria).

▼M8

DEMONSTRAÇÃO DE COMPETÊNCIA

15. Antes de utilizarem de forma rotineira qualquer dos quatro modelos de ensaio validados que seguem este método de ensaio (apêndice 2), os laboratórios devem demonstrar a sua competência técnica, utilizando para o efeito as dez substâncias de base enumeradas no quadro 1. No caso de, por exemplo, uma substância incluída na lista estar indisponível, ou sempre que se justifique, pode utilizar-se outra substância para a qual se disponha de dados adequados de referência *in vivo* e *in vitro* – por exemplo, da lista de produtos químicos de referência (8) –, desde que sejam aplicados os critérios de seleção descritos no quadro 1. A utilização de uma substância de referência alternativa deve ser justificada.

16. No âmbito do ensaio de proficiência, recomenda-se que o utilizador verifique, após a receção dos tecidos, as propriedades de barreira dos mesmos, especificadas pelo produtor do modelo de epiderme humana reconstruída. Este aspeto é de especial importância se os tecidos forem expedidos a longas distâncias ou demorarem muito tempo a chegar. A partir do momento em que um método de ensaio esteja implantado e tenha sido adquirida e demonstrada competência para utilizá-lo, não é necessário efetuar por rotina a referida verificação. Recomenda-se, contudo, que, ao utilizar um método de ensaio, se continue a avaliar periodicamente as propriedades de barreira.

Quadro 1

Substâncias para a demonstração de competência [1]

Substância	N.º de registo CAS	Pontuação *in vivo* [2]	Estado físico	Categoria do sistema GHS da ONU
SUBSTÂNCIAS NÃO CLASSIFICADAS (sem categoria no sistema GHS da ONU)				
Ácido naftalenoacético	86-87-3	0	Sólido	Nenhuma categoria
Isopropanol	67-63-0	0,3	Líquido	Nenhuma categoria
Estearato de metilo	112-61-8	1	Sólido	Nenhuma categoria
Butirato de heptilo	5870-93-9	1,7	Líquido	Nenhuma categoria (*Categoria facultativa 3*) [3]
Salicilato de hexilo	6259-76-3	2	Líquido	Nenhuma categoria (*Categoria facultativa 3*) [3]
SUBSTÂNCIA CLASSIFICADAS (categoria 2 do sistema GHS da ONU)				
Ciclamenaldeído	103-95-7	2,3	Líquido	Cat. 2
1-Bromo-hexano	111-25-1	2,7	Líquido	Cat. 2
Hidróxido de potássio (solução aquosa a 5 %)	1310-58-3	3	Líquido	Cat. 2
1-Metil-3-fenil-1-piperazina	5271-27-2	3,3	Sólido	Cat. 2
Heptanol	111-71-7	3,4	Líquido	Cat. 2

(1) As substâncias para a demonstração de competência são um subconjunto das substâncias utilizadas no estudo de validação; a seleção é baseada nos seguintes critérios: as substâncias químicas (i) estão disponíveis no comércio; (ii) são representativas de toda a gama da escala de irritação de Draize (de não irritante a fortemente irritante); (iii) têm uma estrutura química bem definida; (iv) são representativas ao nível da funcionalidade química utilizada no processo de validação; (v) apresentaram resultados reprodutíveis *in vitro* em múltiplos ensaios e em múltiplos laboratórios; (vi) têm uma boa previsibilidade *in vitro*, e (vii) não estão associadas a um perfil extremamente tóxico (por exemplo, cancerígeno ou tóxico para o sistema reprodutivo) nem a custos de eliminação proibitivos.

(2) Pontuação *in vivo* ao abrigo do método de ensaio B.4 (4);

(3) No âmbito do presente método, a categoria 3 facultativa do sistema GHS da ONU (irritantes ligeiros) (1) é referida como «nenhuma categoria».

▼M8

PROCEDIMENTO

17. Segue-se uma descrição dos componentes e procedimentos de um método de ensaio de epiderme humana reconstruída para efeitos de avaliação da irritação cutânea (ver também o apêndice 3 no que se refere a parâmetros relativos a cada modelo de ensaio). Existem procedimentos operacionais normalizados para os quatro modelos conformes a este método de ensaio (32) (33) (34) (35).

COMPONENTES DO MÉTODO DE ENSAIO DE EPIDERME HUMANA RECONSTITUÍDA

Condições gerais

18. Na reconstrução do epitélio, utilizam-se queratinócitos humanos não transformados. Devem estar presentes várias camadas de células epiteliais viáveis (camada basal, camada espinhosa, camada granulosa), sob um *stratum corneum* funcional. Este último deve ter várias camadas e possuir um perfil lipídico que permita estabelecer uma barreira funcional suficientemente robusta para resistir à penetração rápida de produtos químicos marcadores citotóxicos – por exemplo, SDS ou Triton X-100. A função de barreira deve ser demonstrada e pode avaliar-se determinando a concentração à qual o produto químico de referência reduz a viabilidade dos tecidos em 50 % (CI50) após um tempo de exposição fixo, ou determinando o tempo de exposição necessário para reduzir a viabilidade celular em 50 % (ET50), mediante a aplicação do produto químico de referência a uma concentração específica e fixa. As propriedades de contenção do modelo de epiderme humana reconstruída devem impedir a passagem de matéria para o tecido viável por contorno do *stratum corneum*, que redundaria numa modelação deficiente da exposição cutânea. O modelo de epiderme humana reconstruída não deve estar contaminado por bactérias, vírus, micoplasmas ou fungos.

Condições funcionais

Viabilidade

19. O ensaio utilizado para quantificar a viabilidade é o ensaio MTS (31). As células viáveis do tecido de epiderme humana reconstruída podem reduzir o corante MTT a um precipitado azul de formazano que é depois extraído do tecido com isopropanol (ou solvente semelhante). A densidade ótica do solvente de extração isolado deve ser suficientemente baixa (< 0,1). O formazano extraído pode ser quantificado utilizando um método de medição da absorvância normalizado ou por espetrofotometria HPLC/UPLC (36). Os utilizadores do modelo de epiderme humana reconstruída devem garantir que cada lote de epiderme humana reconstruída utilizado preenche os critérios de controlo negativo. O concetor/fornecedor da epiderme humana reconstruída estabeleceu um intervalo de aceitabilidade (limite superior e inferior) para os valores de densidade ótica dos controlos negativos (nas condições aplicáveis ao método de ensaio de irritação cutânea). Indicam-se no quadro 2 os intervalos de aceitabilidade validados para os quatro modelos de epiderme humana reconstruída que se incluem neste método de ensaio. Os utilizadores de espetrofotometria HPLC/UPLC devem utilizar as gamas de controlo negativo da densidade ótica indicadas no quadro 2 como critério de aceitação para o controlo negativo. Os tecidos tratados com o produto químico de controlo negativo devem, comprovadamente, manter-se estáveis em cultura durante todo o período de exposição do ensaio (medições de viabilidade semelhantes).

Quadro 2

Intervalos de aceitabilidade para os valores de densidade ótica de controlos negativos dos modelos de ensaio incluídos no presente método de ensaio

	Limite inferior de aceitabilidade	Limite superior de aceitabilidade
EpiSkin™ (SM)	≥ 0,6	≤ 1,5
EpiDerm™ SIT (EPI-200)	≥ 0,8	≤ 2,8

▼M8

	Limite inferior de aceitabilidade	Limite superior de aceitabilidade
SkinEthic™ RHE	≥ 0,8	≤ 3,0
LabCyte EPI-MODEL24 SIT	≥ 0,7	≤ 2,5

Função de barreira

20. O *stratum corneum* e a sua composição lipídica devem ser suficientes para resistir a uma penetração rápida de certos produtos químicos marcadores citotóxicos (por exemplo, SDS ou Triton X-100), estimada com base na IC_{50} ou no ET_{50} (quadro 3).

Morfologia

21. O exame histológico do modelo de epiderme humana reconstruída deve revelar uma estrutura de epiderme humana (incluindo um *stratum corneum* com várias camadas).

Reprodutibilidade

22. Os resultados dos controlos positivos e negativos do método de ensaio devem demonstrar reprodutibilidade ao longo do tempo.

Controlo de qualidade

23. O modelo de epiderme humana reconstruída só deve ser utilizado se o concetor/fornecedor demonstrar que cada lote do modelo de epiderme humana reconstruída satisfaz determinados critérios de aptidão para a produção, de entre os quais os de *viabilidade* (ponto 19), *função de barreira* (ponto 20) e *morfologia* (ponto 21) são os mais relevantes. Estes dados devem ser facultados aos utilizadores do método de ensaio, para que possam fazer constar tais informações dos seus relatórios. O concetor/fornecedor de epiderme humana reconstruída estabelece um intervalo de aceitabilidade (limite superior e inferior) para IC_{50} ou ET_{50}. Apenas podem ser utilizados com fiabilidade na previsão de classificações de irritação resultados obtidos com tecidos que possuam as características exigidas. Apresentam-se no quadro 3 os intervalos de aceitabilidade para os quatro modelos de ensaio incluídos no presente método.

Quadro 3

Critérios de controlo de qualidade para a liberação dos lotes dos modelos de ensaio incluídos no presente método de ensaio

	Limite inferior de aceitabilidade	Limite superior de aceitabilidade
EpiSkin™ (SM) (18 horas de tratamento com SDS)(32)	IC_{50} = 1,0 mg/ml	IC_{50} = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SIT (EPI-200) (1 % Triton X-100) (33)	ET_{50} = 4,0 horas	ET_{50} = 8,7 horas
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100) (34)	ET_{50} = 4,0 horas	ET_{50} = 10,0 horas
LabCyte EPI-MODEL24 SIT (18 horas de tratamento com SDS)(35)	IC_{50} = 1,4 mg/ml	IC_{50} = 4,0 mg/ml

▼M8

Aplicação dos produtos químicos em estudo e de controlo

24. Devem utilizar-se em cada série, pelo menos, três replicados de cada produto químico em estudo e dos produtos químicos de controlo. Tanto no caso dos produtos líquidos como dos sólidos, deve aplicar-se uma quantidade do produto químico em estudo suficiente para cobrir uniformemente a superfície da epiderme, evitando uma dose infinita, ou seja, entre 26 e 83 μl/cm^2 (ver apêndice 3). No caso dos sólidos, a superfície da epiderme deve ser humidificada, com água desionizada ou destilada, antes da aplicação, para melhorar o contacto entre o produto e a superfície da epiderme. Sempre que possível, os sólidos devem ser ensaiados na forma de pó fino. Em alguns casos, pode ser utilizada uma malha de *nylon* para ajudar a espalhar (ver apêndice 3). Após o período de exposição, o produto químico em estudo deve ser cuidadosamente removido da superfície da epiderme, por lavagem com uma solução-tampão aquosa ou uma solução a 0,9 % de NaCl. Consoante os modelos de ensaio de epiderme humana reconstruída utilizados, o período de exposição varia entre 15 e 60 minutos, e a temperatura de incubação entre 20 e 37 °C. Estes períodos de exposição e as temperaturas são otimizados para cada método de ensaio de epiderme humana reconstruída e representam as diferentes propriedades intrínsecas dos modelos de ensaio (por exemplo, função de barreira) (ver apêndice 3).

25. Devem utilizar-se em cada ensaio amostras de controlo negativo (CN) e controlo positivo (CP) em paralelo para demonstrar que a viabilidade (utilizando o código NC), a função de barreira e a consequente sensibilidade dos tecidos (com recurso ao controlo positivo) dos tecidos se encontram dentro de um determinado intervalo de aceitabilidade histórico. Sugere-se a utilização de solução aquosa a 5 % de SDS como produto químico de controlo positivo. Como produto químico de controlo negativo, sugere-se a utilização de água ou de solução salina tamponada de fosfato (PBS).

Medição da viabilidade celular

26. Segundo o procedimento de ensaio, é essencial que a medição da viabilidade não seja efetuada imediatamente após a exposição ao produto químico em estudo, mas após um período suficientemente longo de incubação dos tecidos, lavados após o tratamento num meio fresco. Esse período permite tanto a recuperação de efeitos citotóxicos fracos, como a manifestação de efeitos citotóxicos claros. Um período de incubação pós-tratamento de 42 horas foi considerado ótimo durante a otimização do ensaio de dois dos modelos de ensaio baseados na epiderme humana reconstruída que serviram de base ao presente método de ensaio (11) (12) (13) (14) (15).

27. O ensaio MTT é um método quantitativo normalizado que deve ser utilizado para medir a viabilidade celular no âmbito do presente método de ensaio. É compatível com a utilização numa construção de tecidos tridimensional. Coloca-se a amostra dos tecidos numa solução de MTT com uma concentração apropriada (0,3-1 mg/ml, por exemplo), durante 3 horas. O MTT é convertido em azul de formazano pelas células viáveis. O precipitado de azul de formazano é depois extraído dos tecidos com um solvente (por exemplo, isopropanol ou isopropanol acidificado), medindo-se a concentração de formazano por determinação da densidade ótica ao comprimento de onda de 570 nm, utilizando um intervalo de banda de filtro de ±30 nm, ou por espetrometria HPLC/UPLC (ver ponto 34) (36).

28. As propriedades óticas do produto químico em estudo ou a sua ação química sobre o MTT (os produtos químicos são passíveis, por exemplo, de impedir ou reverter a coloração, bem como de provocá-la), podem interferir no

▼M8

ensaio, conduzindo a uma estimativa falsa de viabilidade. Isto pode suceder se o produto não for completamente removido dos tecidos por lavagem ou se penetrar na epiderme. Se o produto agir diretamente no MTT (redutor do MTT), for naturalmente corado ou adquirir coloração durante o tratamento dos tecidos, devem ser utilizados produtos químicos de controlo suplementares, que permitam detetar interferências do produto químico em estudo na técnica de medição da viabilidade e corrigir esse efeito (ver pontos 29 e 33). A descrição pormenorizada do modo de correção da redução direta do MTT e das interferências de agentes corantes está disponível nos PON para os quatro modelos validados incluídos no presente método de ensaio (32) (33) (34) (35).

29. Para identificar os redutores diretos do MTT, os produtos químicos de ensaio devem ser adicionados a soluções de MTT recentemente preparadas. Se a mistura de MTT que contém o produto químico em estudo se tornar azul/ /púrpura, considera-se que o produto em causa reduz diretamente o MTT, devendo proceder-se a um controlo funcional adicional nos tecidos não viáveis de epiderme humana reconstruída, independentemente do recurso à medição da absorvância padrão ou à espetrofotometria HPLC/UPLC. Este controlo funcional complementar utiliza tecidos mortos, que apenas possuem atividade metabólica residual, mas que absorvem o produto químico em estudo de forma semelhante aos tecidos viáveis. Cada produto químico em estudo que reduz o MTT é aplicado em, pelo menos, dois tecidos replicados mortos, submetidos a todo o processo de ensaio, a fim de obter uma redução não específica do MTT (NSMTT) (32) (33) (34) (35). Um único controlo do NSMTT é suficiente para cada produto químico em estudo, independentemente do número de ensaios ou de ensaios/séries de ensaios independentes realizados. A viabilidade real do tecido é calculada como a percentagem de viabilidade dos tecidos obtida com os tecidos vivos expostos ao MTT, menos a percentagem de redução não específica do MTT, obtida com os tecidos occisados expostos ao mesmo redutor do MTT, calculado em relação ao controlo negativo concomitante à correção do teste (% NSMTT).

30. Para identificar eventuais interferências de produtos em estudo químicos coloridos ou que adquirem cor quando entram em contacto com a água ou com o isopropanol, e determinar a necessidade de controlos complementares, deve efetuar-se uma análise espetral do produto químico em estudo na água (ambiente durante a exposição) e/ou isopropanol (solução de extração). Se a solução do produto na água e/ou em isopropanol absorver luz na gama 570 ±30 nm, deve-se proceder a novos controlos de corante ou, em alternativa, recorrer à espetrofotometria HPLC/UPLC, caso em que não são necessários tais controlos (ver pontos 33 e 34). Ao efetuar a medição da absorvância-padrão, aplica-se o produto químico em estudo com cor interferente em, pelo menos, dois tecidos replicados viáveis, que são objeto do procedimento de ensaio, mas são incubados num meio, em vez de o serem numa solução de redução do MTT, durante a fase de incubação do MTT para se obter um controlo da cor não específica (NSC_{vivo}). O controlo NSC_{vivo} deve ser realizado em paralelo com os ensaios do produto químico em estudo; no caso de ensaios múltiplos, é necessário realizar um controlo NSC_{vivo} independente com cada ensaio realizado (em cada série) devido à variabilidade biológica intrínseca dos tecidos vivos. A viabilidade real do tecido é calculada como a percentagem de viabilidade dos tecidos obtida com tecidos vivos expostos ao produto químico em estudo interferente menos a percentagem de cor não específica obtida com tecidos vivos expostos ao produto químico em causa e incubados em meio sem MTT, calculada em simultâneo com a correção do ensaio (% NSC_{vivo}).

31. Os produtos químicos em estudo que, comprovadamente, provocam uma redução direta do MTT (ver ponto 29) e interferências de cor (ver ponto 30) requerem um terceiro conjunto de controlos, para além dos controlos NSMTT e NCS_{vivo} descritos nos pontos anteriores, aquando da

▼M8

mensuração da absorvância-padrão (DO). Tal é normalmente o caso dos produtos de cor escura, que interferem com o ensaio do MTT (por exemplo, azuis, púrpura, preto), uma vez que a sua cor intrínseca impede a avaliação da capacidade de reduzirem diretamente o MTT, conforme descrito no ponto 29. Os produtos químicos em estudo podem ligar-se a tecidos vivos e sujeitos a occisão, pelo que o controlo do NSMTT permite não só corrigir uma potencial redução direta do MTT pelo produto químico em estudo, como também uma interferência de cor resultante da ligação do produto químico aos tecidos sujeitos a occisão. Tal pode levar a uma dupla correção para as interferências de cor, uma vez que o controlo NCS_{vivo} corrige já as interferências de cor que resultam da ligação do produto químico em estudo aos tecidos vivos. Para evitar uma eventual dupla correção para a interferência da cor, é necessário realizar um terceiro controlo da cor não específico dos tecidos mortos (NSC_{mortos}). Neste controlo adicional, aplica-se o produto químico em estudo em, pelo menos, dois replicados dos tecidos mortos submetidos à totalidade do procedimento de ensaio, mas que são incubados com meio durante a etapa de incubação com MTT, em vez da solução de MTT. Basta um único NSC_{morto} controlado por produto químico em estudo, independentemente do número de ensaios ou dos ensaios individuais realizados, mas deve ser efetuado em paralelo com o controlo do NSMTT e, sempre que possível, com o mesmo lote de tecidos. A viabilidade real do tecido é calculada como a percentagem de viabilidade dos tecidos obtida com tecidos vivos expostos ao produto químico em estudo menos a percentagem de NSMTT menos a percentagem de NSC_{vivo} mais a percentagem não específica obtida com tecidos mortos expostos ao produto químico em causa e incubados em meio sem MTT, calculada em relação à amostra do controlo negativo realizado em simultâneo com a correção do ensaio (% NSC_{morto}).

32. É importante assinalar que a redução não específica do MTT e as interferências de cor não específicas podem aumentar as leituras do extrato de tecido acima da gama de linearidade do espetrofotómetro. Assim, cada laboratório deve determinar a gama de linearidade do respetivo espetrofotómetro com o MTT formazano (n.º CAS 57360-69-7), a partir de uma fonte comercial, antes de se iniciar o ensaio de produtos químicos para ensaio para fins regulamentares. A medição da absorvância-padrão (DO) com espetrofotómetro é adequada para avaliar produtos químicos em estudo que sejam redutores diretos do MTT e com interferência de cor, se as DO dos extratos de tecidos obtidos com o produto químico em estudo, sem qualquer correção, para a redução direta do MTT e/ou para a interferência de cor, se situarem na gama de medição linear do espetrofotómetro, ou se a percentagem de viabilidade não corrigida obtida com o produto químico em estudo for ≤ 50 %. No entanto, os resultados relativos aos produtos químicos em estudo que produzem percentagens de NSMTT e/ou de NSC_{vivos} com ≥ 50 % do controlo negativo devem ser interpretados com precaução, uma vez que este é o valor-limite utilizado para distinguir os produtos químicos classificados dos não classificados (ver ponto 36).

33. No caso de produtos químicos corados que não sejam compatíveis com a medição da absorvância-padrão devido a uma interferência demasiado forte com o ensaio do MTT, pode utilizar-se o procedimento alternativo por espetrofotometria HPLC/UPLC para medir o formazano (ver ponto 34) (36). O sistema HPLC/UPLC permite a separação do formazano do produto químico em estudo antes da sua quantificação (36). Por este motivo, nunca são necessários controlos NCS_{vivos} ou NCS_{mortos} quando se utiliza espetrofotometria HPLC/UPLC, independentemente do produto químico em estudo. Contudo, devem utilizar-se controlos NSMTT se se suspeitar que o produto químico em estudo reduz diretamente o MTT, ou se apresenta uma cor que impede a avaliação da capacidade de reduzir diretamente o MTT (conforme descrito no ponto 29). Caso se utilize a espetrofotometria HPLC/UPLC para medir o formazano, a percentagem de viabilidade do tecido é calculada como percentagem de todos os picos do MTT formazano obtidos com tecidos vivos expostos ao produto químico em estudo em relação a um pico obtido

▼M8

em paralelo com o controlo negativo. Para os produtos químicos em estudo capazes de reduzir diretamente o MTT, a viabilidade dos tecidos é calculada como a percentagem de viabilidade dos tecidos obtida com tecidos vivos expostos ao produto químico em estudo menos a % NSMTT. Por último, é de notar que os redutores diretos do MTT, passíveis de interferirem também com as cores, retidos nos tecidos após o tratamento, reduzem o MTT, de tal forma que provocam lesões oculares (utilizando a medida normal de DO) ou áreas de picos (utilizando espetrofotometria de UPLC/HPLC) de extratos de tecidos testados que se encontram fora do intervalo de linearidade do espetrofotómetro não podem ser avaliados, embora se preveja que isso ocorra apenas em situações muito raras.

34. A espetrofotometria HPLC/UPLC pode também ser utilizada com todos os tipos de produtos químicos em estudo (redutores de MTT e não redutores de MTT) para a medição de MTT formazano (36). Devido à diversidade de sistemas de espetrofotometria HPLC/UPLC, a qualificação do sistema em causa deve ser demonstrada antes da sua utilização para quantificar o MTT formazano de extratos de tecidos, através do cumprimento dos critérios de aceitação de um conjunto de parâmetros de qualificação normalizados, descritos na *U.S. Food and Drug Administration guidance for industry on bio-analytical method validation*. Estes parâmetros-chave e os respetivos critérios de aceitação são apresentados no apêndice 4. Após o cumprimento dos critérios de aceitação definidos no apêndice 4, considera-se o sistema de espetrofotometria HPLC/UPLC qualificado para medir o MTT formazano nas condições experimentais descritas no presente método de ensaio.

Critérios de aceitabilidade

35. Em cada método que utilize lotes válidos do modelo de epiderme humana reconstruída (ver o ponto 23), a densidade ótica dos tecidos tratados com o produto químico de controlo negativo deve refletir a qualidade dos tecidos sujeitos a expedição, às etapas de receção e a todos os processos do protocolo. A densidade ótica dos produtos químicos de controlo não deve ser inferior aos limites históricos estabelecidos. Da mesma forma, os tecidos tratados com o CP, ou seja, a solução aquosa a 5 % de SDS, devem ter a capacidade de reagir a um produto químico irritante nas condições do método de ensaio (ver apêndice 3 para mais informações e PON dos quatro modelos de ensaio incluídos nesta *Test Guideline* (32) (33) (34) (35). As medidas conexas e adequadas de variabilidade entre tecidos replicados, ou seja, os desvios-padrão (DP) devem estar em conformidade com os limites de aceitação estabelecidos para o modelo de ensaio utilizado (ver apêndice 3).

Interpretação dos resultados e modelo de previsão

36. Os valores de densidade ótica obtidos para cada produto químico em estudo podem ser utilizados para calcular a percentagem de viabilidade normalizada em relação ao controlo negativo, que é fixada em 100 %. Caso se utilize a espetrofotometria HPLC/UPLC, a percentagem de viabilidade do tecido é calculada como percentagem de todos os picos do MTT formazano obtidos com tecidos vivos expostos ao produto químico em estudo em relação a um pico obtido em paralelo com o controlo negativo. Importa definir claramente e documentar a percentagem de viabilidade celular que estabelece a diferenciação entre os produtos químicos em estudo irritantes e não classificados e o(s) método(s) estatístico(s) utilizado(s) para avaliar os resultados e identificar os produtos químicos irritantes, devendo ainda demonstrar-se que são adequados (ver PON dos modelos de ensaio para informação). Indicam-se a seguir os valores-limite de diferenciação para a previsão de efeitos irritantes:

▼M8

— O produto químico em estudo é identificado em conformidade com os requisitos de classificação e rotulagem dos sistemas GHS da ONU/CRE (categoria 2 ou categoria 1) se a percentagem média de viabilidade dos tecidos após exposição e incubação pós-tratamento for inferior ou igual (≤) a 50 %. Dado que os modelos de ensaio de epiderme humana reconstruída abrangidos por este método não permitem diferenciar as categorias 1 e 2 do sistema GHS da ONU, é necessário obter mais dados sobre corrosão cutânea para decidir a classificação final [ver também o documento de orientação da OCDE sobre a IATA (3)]. Caso o produto químico em estudo seja considerado não corrosivo (por exemplo, com base nos métodos de ensaio M.40, B.40.A ou B.65) e a viabilidade dos tecidos após exposição e incubação pós-tratamento for inferior ou igual a 50 %, considera-se que é irritante para a pele, em conformidade com a categoria 2 do sistema GHS da ONU.

— Consoante o quadro regulamentar dos países membros, o produto químico em estudo pode ser considerado não irritante para a pele, em conformidade com os sistemas GHS da ONU/CRE, ou classificado de «nenhuma categoria», se a viabilidade dos tecidos depois da exposição e da incubação subsequente ao tratamento for superior a 50 %.

DADOS E RELATÓRIOS

Dados

37. Para cada série de ensaios, devem apresentar-se num quadro os dados respeitantes a cada replicado de tecidos (por exemplo, valores de densidade ótica e percentagens de viabilidade celular calculadas para cada produto químico em estudo, bem como a classificação correspondente), incluindo os dados relativos às repetições de ensaios eventualmente efetuadas. Deve igualmente ser indicada para cada série de ensaios a média ±desvio-padrão. Devem referir-se ainda, para cada produto químico em estudo, as interações observadas com o MTT e se é corado.

Relatório de ensaio

38. O relatório de ensaio deve conter as seguintes informações:

Produtos químicos em estudo e de controlo

— Substância monocomponente: dados de identificação química, como as denominações IUPAC ou CAS, número CAS, código SMILES ou InChI, fórmula estrutural, pureza, identidade química das impurezas, caso se justifique e seja exequível, etc.;

— Substância multicomponentes, UVCB e mistura: na medida do possível, pela identidade química (ver acima), ocorrência quantitativa e principais propriedades físico-químicas dos componentes;

— Aspeto físico, hidrossolubilidade e outras propriedades físico-químicas pertinentes;

— Proveniência, número do lote, se disponíveis;

— Tratamento dos produtos químicos em estudo/de controlo, se for o caso (aquecimento ou moagem, por exemplo), antes do ensaio;

— Estabilidade do produto químico em estudo, data-limite de utilização ou data de reanálise, se conhecidas;

— Condições de armazenagem;

Modelo de epiderme humana reconstruída, protocolo utilizado (e fundamentação do mesmo, se pertinente).

▼**M8**

Condições de realização do ensaio

— Modelo de epiderme humana reconstruída utilizado (incluindo número do lote);

— Informações sobre a calibração do dispositivo de medição (por exemplo, espetrofotómetro); comprimento de onda e gama de comprimentos de onda (se pertinente) utilizados para a quantificação do MTT formazano; descrição do método utilizado para quantificar o MTT formazano;

— Descrição da qualificação do sistema de sistema de espetrofotometria HPLC/UPLC, se pertinente; informações completas que substanciem o modelo específico de epiderme humana reconstruída utilizado, incluindo dados sobre o desempenho do mesmo, por exemplo:

i) viabilidade;

ii) função de barreira;

iii) morfologia;

iv) reprodutibilidade e previsibilidade;

v) controlos de qualidade (CQ) do modelo;

— Referência a dados anteriormente publicados sobre o modelo; tal deve incluir, sem caráter limitativo, a aceitabilidade dos dados de controlo da qualidade com referência a dados históricos de lotes.

— Demonstração da competência na execução do método de ensaio antes da sua utilização por rotina através do ensaio das substâncias de referência.

Procedimento de ensaio

— Pormenores sobre o procedimento de ensaio utilizado (incluindo procedimentos de lavagem utilizados após o período de exposição); doses do produto químico em estudo e dos produtos químicos de controlo utilizados;

— Duração e temperatura da exposição e do período de incubação após a exposição;

— Indicação dos controlos utilizados nos redutores diretos do MTT e/ou dos produtos químicos em estudo que apresentem coloração, se pertinente;

— Número de tecidos replicados utilizados para cada produto químico em estudo e controlos (CP, controlo negativo e NSMTT, NSC_{vivos} e NSC_{mortos}, se pertinente);

— Descrição do modelo de critérios/previsão de decisão aplicado com base no modelo de epiderme humana reconstruída utilizado;

— Descrição de quaisquer modificações introduzidas no procedimento de ensaio (incluindo procedimentos de lavagem).

Critérios de aceitação de série de ensaios e de ensaios

— Valores médios dos controlos positivos e negativos e intervalos de aceitação com base em dados históricos; variabilidade aceitável entre os tecidos replicados para os controlos positivos e negativos;

▼**M8**

— Variabilidade aceitável entre os tecidos replicados para o produto químico em estudo;

Resultados

— Quadro com os dados correspondentes a cada produto químico em estudo e a cada replicado, incluindo as medições de densidade ótica ou zonas de pico do MTT formazano, percentagem de viabilidade dos tecidos, percentagem média de viabilidade dos tecidos e desvio-padrão;

— Se for caso disso, resultados dos controlos utilizados nos produtos químicos em estudo de redução direta do MTT e/ou do ensaio de coloração dos produtos químicos em estudo, incluindo as DO ou a zona de pico do MTT formazano, percentagens de NSMTT, de NSC_{vivos} e de NSC_{mortos}, DP e a percentagem final correta de viabilidade dos tecidos;

— Resultados obtidos com o(s) produto(s) químico(s) em estudo e os produtos químicos de controlo à luz dos critérios de aceitação de ensaios e séries de ensaios definidos;

— Descrição de outros efeitos eventualmente observados;

— Classificação atribuída, mencionando o modelo de previsão ou os critérios de decisão utilizados.

Discussão dos resultados

Conclusões

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(1) Nações Unidas (ONU) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second Revised Edition, UN New York and Geneva, 2013. Disponível em: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) EURL-ECVAM (2009). Statement on the "Performance Under UN GHS of Three *In Vitro* Assays for Skin Irritation Testing and the Adaptation of the Reference Chemicals and Defined Accuracy Values of the ECVAM Skin Irritation Performance Standards", Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC31), 9 April 2009. Disponível em: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication//ESAC31_skin-irritation-statement_20090922.pdf

(3) OCDE (2014). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 203), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(4) Capítulo B.4 deste anexo, «Toxicidade aguda: irritação/corrosão dérmica»

(5) Chapter B.40 of this Annex, *In Vitro* Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance (TER).

(6) Chapter B.40bis of this Annex, *In Vitro* Skin Corrosion: Reconstructed Human Epidermis (RHE) test method.

(7) Capítulo B.65 deste anexo: «Método de ensaio da membrana de estanquidade *in vitro*»

▼**M8**

(8) OCDE (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human *Epidermis* (RhE) Test Methods for Skin Irritation in Relation to TG 439. Environment, health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 220). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(9) OCDE (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(10) Fentem, J.H., Briggs, D., Chesné, C., Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Roguet, R., van de Sandt, J.J. M. and Botham, P. (2001). A Prevalidation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation, Results and Evaluation by the Management Team, *Toxicol. in Vitro* 15, 57-93.

(11) Portes, P., Grandidier, M.-H., Cohen, C. and Roguet, R. (2002). Refinement of the EPISKIN Protocol for the Assessment of Acute Skin Irritation of Chemicals: Follow-Up to the ECVAM Prevalidation Study, *Toxicol. in Vitro* 16, 765–770.

(12) Kandárová, H., Liebsch, M., Genschow, E., Gerner, I., Traue, D., Slawik, B. and Spielmann, H. (2004). Optimisation of the EpiDerm Test Protocol for the Upcoming ECVAM Validation Study on *In Vitro* Skin Irritation Tests, *ALTEX* 21, 107–114.

(13) Kandárová, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D. and Spielmann, H. (2005), The EpiDerm Test Protocol for the Upcoming ECVAM Validation Study on *In Vitro* Skin Irritation Tests – An Assessment of the Performance of the Optimised Test, *ATLA* 33, 351-367.

(14) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Portes, P., Roguet, R. and Rubinsteen, G. (2005). The *In Vitro* Acute Skin Irritation of Chemicals: Optimisation of the EPISKIN Prediction Model Within the Framework of the ECVAM Validation Process, *ATLA* 33, 329-349.

(15) Zuang, V., Balls, M., Botham, P.A., Coquette, A., Corsini, E., Curren, R.D., Elliot, G.R., Fentem, J.H., Heylings, J.R., Liebsch, M., Medina, J., Roguet, R., van De Sandt, J.J.M., Wiemann, C. and Worth, A. (2002). Follow-Up to the ECVAM Prevalidation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation, The European Centre for the Validation of Alternative Methods Skin Irritation Task Force report 2, *ATLA* 30, 109-129.

(16) Spielmann, H., Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotovio, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Report on the Validity of the EPISKIN and EpiDerm Assays and on the Skin Integrity Function Test, *ATLA* 35, 559-601.

(17) Hoffmann S. (2006). ECVAM Skin Irritation Validation Study Phase II: Analysis of the Primary Endpoint MTT and the Secondary Endpoint IL1-α.

(18) Eskes C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Selection of Test Chemicals, *ATLA* 35, 603-619.

(19) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Lelièvre, D., Roguet, R., Tinois-Tessonneaud, E. and Leclaire, J. (2007). *In Vitro* Acute Skin Irritancy of Chemicals Using the Validated EPISKIN Model in a Tiered Strategy - Results and Performances with 184 Cosmetic Ingredients, *ALTEX*, 14, 351-358.

▼**M8**

(20) EURL-ECVAM (2007). Statement on the Validity of *In Vitro* Tests for Skin Irritation, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC26), 27 April 2007. Disponível em: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication//ESAC26_statement_SkinIrritation_20070525_C.pdf

(21) EURL-ECVAM. (2007). Performance Standards for Applying Human Skin Models to *In Vitro* Skin Irritation Testing. *N.B.: Trata-se das normas de desempenho originais utilizadas para validação dos dois métodos de ensaio. Estes normas de desempenho já não devem ser utilizadas, uma vez que já está disponível uma versão atualizada (8).*

(22) EURL-ECVAM. (2008). Statement on the Scientific Validity of *In Vitro* Tests for Skin Irritation Testing, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC29), 5 November 2008. https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication/ESAC_Statement_SkinEthic-EpiDerm-FINAL-0812-01.pdf

(23) OCDE (2010). Explanatory Background Document to the OECD Draft Test Guideline on *In Vitro* Skin Irritation Testing. Environment, Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, (No 137), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(24) Katoh, M., Hamajima, F., Ogasawara, T. and Hata K. (2009). Assessment of Human Epidermal Model LabCyte EPI-MODEL for *In Vitro* Skin Irritation Testing According to European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)-Validated Protocol, *J Toxicol* Sci, 34, 327-334

(25) Katoh, M. and Hata K. (2011). Refinement of LabCyte EPI-MODEL24 Skin Irritation Test Method for Adaptation to the Requirements of OECD Test Guideline 439, *AATEX*, 16, 111-122

(26) OCDE (2011). Validation Report for the Skin Irritation Test Method Using LabCyte EPI-MODEL24. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 159), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(27) OCDE (2011). Peer Review Report of Validation of the Skin Irritation Test Using LabCyte EPI-MODEL24. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 155), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(28) Kojima, H., Ando, Y., Idehara, K., Katoh, M., Kosaka, T., Miyaoka, E., Shinoda, S., Suzuki, T., Yamaguchi, Y., Yoshimura, I., Yuasa, A., Watanabe, Y. and Omori, T. (2012). Validation Study of the *In Vitro* Skin Irritation Test with the LabCyte EPI-MODEL24, *Altern Lab Anim*, 40, 33-50.

(29) Welss, T., Basketter, D.A. and Schröder, K.R. (2004). *In Vitro* Skin Irritation: Fact and Future. State of the Art Review of Mechanisms and Models, *Toxicol. In Vitro* 18, 231-243.

(30) Eskes, C. *et al.* (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data within the European Framework: Workshop Recommendations. Regul.*Toxicol*.Pharmacol. 62, 393-403).

(31) Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.

▼**M8**

(32) EpiSkin™ (February 2009). SOP, Version 1.8ECVAM Skin Irritation Validation Study: Validation of the EpiSkin™ Test Method 15 min - 42 hours for the Prediction of acute Skin Irritation of Chemicals

(33) EpiDerm™ (Revised March 2009). SOP, Version 7.0, Protocol for: *In Vitro* EpiDerm™ Skin Irritation Test (EPI-200-SIT), for Use with MatTek Corporation's Reconstructed Human Epidermal Model EpiDerm (EPI-200).

(34) SkinEthic™ RHE (February 2009) SOP, Version 2.0, SkinEthic Skin Irritation Test-42bis Test Method for the Prediction of Acute Skin Irritation of Chemicals: 42 Minutes Application + 42 Hours Post-Incubation.

(35) LabCyte (June 2011). EPI-MODEL24 SIT SOP, Version 8.3, Skin Irritation Test Using the Reconstructed Human Model "LabCyte EPI-MODEL24"

(36) Alépée, N., Barroso, J., De Smedt, A., De Wever, B., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Templier, M., and McNamee, P. Use of HPLC/UPLC-Spectrophotometry for Detection of MTT Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)-Based Test Methods Employing the MTT Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. Manuscrito em preparação.

(37) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. May 2001. Disponível em: [http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf].

(38) Harvell, J.D., Lamminstausta, K., and Maibach, H.I. (1995). Irritant Contact Dermatitis, in: Practical Contact Dermatitis, pp 7-18, (Ed. Guin J. D.). Mc Graw-Hill, New York.

(39) EURL-ECVAM (2009). Performance Standards for *In Vitro* Skin Irritation Test Methods Based on Reconstructed Human Epidermis (RhE). *Nota: Esta é a versão atual das normas de desempenho do ECVAMS, que foram atualizadas em 2009 tendo em vista a implementação do GHS da ONU. Estas normas não devem ser utilizadas, dado que se encontra disponível uma versão atualizada (8) relacionada com a presente TG.*

(40) EURL-ECVAM. (2009). ESAC Statement on the Performance Standards (PS) for *In Vitro* Skin Irritation Testing Using Reconstructed Human Epidermis, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC31), 8 July 2009.

(41) EC (2001). Directiva 2001/59/CE da Comissão, de 6 de agosto de 2001, que adapta ao progresso técnico pela vigésima oitava vez a Directiva 67/548/CEE do Conselho, relativa à aproximação das disposições legislativas, regulamentares e administrativas respeitantes à classificação, embalagem e rotulagem das substâncias perigosas, Jornal Oficial da União Europeia L 225 de 21.8.2001, p. 1-333.

▼M8

Apêndice 1

DEFINIÇÕES

Adequação: Relação do ensaio com o efeito em causa; pertinência e utilidade do ensaio para o fim em vista. Traduz a medida em que o ensaio mede ou prevê corretamente o efeito biológico em causa. A adequação compreende a exatidão (concordância) do método de ensaio (9).

Concordância: Mede o desempenho do método de ensaio no caso dos modelos cujos resultados sejam estabelecidos em função de categorias e constitui um dos aspetos da adequação. Este termo e o termo «exatidão» são muitas vezes utilizados indistintamente para indicar a proporção de produtos químicos testados que são corretamente classificados como positivos ou negativos. A concordância é altamente dependente da prevalência do produto químico em estudo positivos no tipo de produto químico em estudo (9).

CP: Controlo positivo – replicado que contém todos os componentes do sistema de ensaio e foi tratado com um produto químico que, comprovadamente, induz reação positiva. Para que se possa determinar a variabilidade no tempo da reação a esta amostra de controlo, essa reação não deve ser excessivamente positiva.

Dose infinita: Quantidade de produto químico em estudo aplicada à epiderme que excede a quantidade necessária para cobrir completa e uniformemente a superfície da epiderme.

Ensaio alternativo: Ensaio destinado a substituir um ensaio de rotina aceite para identificação de perigos e/ou avaliação de riscos, que se concluiu proporcionar proteção equivalente, ou melhorar a proteção, da saúde pública e animal ou do ambiente, consoante o caso, comparativamente ao ensaio de rotina aceite, no que respeita a todos os produtos químicos e situações de ensaio possíveis (9).

Especificidade: Proporção dos produtos químicos em estudo negativos/inativos que são corretamente classificados pelo ensaio. Constitui uma medida da exatidão de um método de ensaio cujos resultados sejam estabelecidos em função de categorias e é um aspeto importante a ter em conta na avaliação da adequação do método de ensaio (9).

Exatidão: Grau de acordo entre os resultados do método de ensaio e os valores de referência aceites. Constitui uma medida do desempenho do método e um dos aspetos da adequação. Este termo e o termo «concordância» são muitas vezes utilizados indistintamente para indicar a proporção de resultados corretos de um método de ensaio (9).

ET_{50}: Pode ser estimado determinando o tempo de exposição necessário para reduzir a viabilidade celular em 50 %, após aplicação de uma dada concentração fixa de um marcador químico; ver também IC_{50}.

Fiabilidade: Medida em que, utilizando o mesmo protocolo, um método de ensaio pode ser continuadamente reproduzido no mesmo laboratório e em laboratórios diferentes. A fiabilidade é avaliada com base nos valores calculados das reprodutibilidades intralaboratorial e interlaboratorial (9).

HPLC: Cromatografia líquida de alta resolução.

IATA: Abordagem integrada de ensaio e avaliação.

IC_{50}: Pode estimar-se através da determinação da concentração à qual um produto químico de referência reduz a viabilidade dos tecidos em 50 % (IC_{50}) após um tempo de exposição fixo, ver também ET_{50}.

▼M8

Mistura: Uma mistura ou solução composta por duas ou mais substâncias.

MTT: Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (azul de tiazolilo).

NSC_{mortos}: Cor não específica em tecidos mortos.

NSC_{vivos}: Cor não específica em tecidos vivos.

NSMTT: Redução não específica do MTT.

Normas de desempenho: Normas associadas a um método de ensaio validado com base nas quais pode ser avaliada a comparabilidade de um método de ensaio proposto que lhe seja funcional e mecanisticamente similar. Incluem: (i) componentes essenciais do método de ensaio; (ii) uma lista mínima de produtos químicos de referência, escolhidos de entre os produtos químicos utilizados para demonstrar o desempenho aceitável do método de ensaio validado; e (iii) níveis de exatidão e fiabilidade comparáveis, baseados no que foi obtido para o método de ensaio validado, que o método de ensaio proposto deve demonstrar quando avaliado pela utilização da lista mínima de produtos químicos de referência (9).

Produto químico: Uma substância ou mistura.

Produto químico em estudo: Qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado o presente método de ensaio.

Sensibilidade: Proporção dos produtos químicos em estudo positivos/ativos que são corretamente classificados pelo ensaio. Constitui uma medida da exatidão de um método de ensaio cujos resultados sejam estabelecidos em função de categorias e é um aspeto importante a ter em conta na avaliação da adequação do método de ensaio (9).

Série de ensaios: Uma série de ensaios consiste no ensaio de um ou mais produtos químicos em estudo em simultâneo com um controlo negativo e um controlo positivo.

Sistema GHS (Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos, da Organização das Nações Unidas (ONU): Sistema que propõe a classificação dos produtos químicos (substâncias e misturas) em função de tipos e níveis normalizados de perigos físicos, sanitários e ambientais e trata ainda dos correspondentes elementos de comunicação, como pictogramas, palavras-sinal, advertências de perigo, recomendações de prudência e fichas de dados de segurança, de modo a transmitir informações sobre os efeitos indesejáveis do produto em causa, com vista à proteção das pessoas (empregadores, trabalhadores, transportadores, consumidores, pessoal dos serviços de emergência, etc.) e do ambiente (1).

Substância: Um elemento químico e os seus compostos no estado natural ou obtidos por qualquer processo de produção, incluindo qualquer aditivo necessário para preservar a sua estabilidade e qualquer impureza derivada do processo utilizado, mas excluindo qualquer solvente que possa ser separado sem afetar a estabilidade da substância nem modificar a sua composição.

▼**M8**

Substância monocomponente: Substância, definida pela sua composição quantitativa, da qual um dos principais componentes está presente num teor de, pelo menos, 80 % (m/m).

Substância multicomponentes: Substância, definida pela sua composição quantitativa, da qual mais de um dos principais componentes está presente numa concentração ≥ 10 % (m/m) e < 80 % (m/m). As substâncias multicomponentes resultam de processos de fabrico. A diferença entre uma mistura e uma substância multicomponentes reside em que a primeira se obtém misturando duas ou mais substâncias, sem reação química. As substâncias multicomponentes resultam de reações químicas.

UPLC: Cromatografia líquida de muito alta resolução.

UVCB: Substâncias de composição desconhecida ou variável, produtos de reação complexos ou materiais biológicos.

Viabilidade celular: Parâmetro que mede a atividade total de uma população celular (por exemplo, em termos de capacidade das desidrogenases mitocondriais celulares para reduzirem o corante vital MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2--il)-2,5-difeniltetrazólio, azul de tiazolilo]; consoante o indicador determinado e o tipo de ensaio realizado, é possível correlacionar a viabilidade celular com o número total de células vivas e/ou a vitalidade dessas células.

▼**M8**

Apêndice 2

MODELOS DE ENSAIO INCLUÍDOS NESTE MÉTODO DE ENSAIO

N.º	Nome do modelo de ensaio	Tipo de estudo de validação	Referências
1	EpiSkin™	Estudo prospetivo de validação (2003-2007). Os componentes deste modelo foram utilizados para definir os componentes essenciais do método de ensaio das normas de desempenho do ECVAM original e atualizado (39) (40) (21) (*). Além disso, os dados do método relativos à identificação de substâncias classificadas e não classificadas constituíram a base principal da definição dos valores de especificidade e sensibilidade das normas de desempenho originais (*).	(2) (10) (11) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (23) (32) (39) (40)
2	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	EpiDerm™ (*original*): Inicialmente, o modelo de ensaio foi submetido a validação prospetiva completa, juntamente com o n.º 1, desde 2003--2007. Os componentes deste modelo foram utilizados para definir os componentes essenciais do método de ensaio das normas de desempenho do ECVAM original e atualizado (39) (40) (21) (*). **EpiDerm™ SIT (EPI-200):** Em 2008 (*), as normas de desempenho do ECVAM foram utilizadas para validar uma alteração à EpiDerm™ original.	(2) ((10) (12) (13) (15) (16) (17) (18) (20) (21) (23) (33) (39) (40) (2) (21) (22) (23) (33)
3	SkinEthic™ RHE	Estudo de validação com base nas normas de desempenho ECVAM originais (21) em 2008 (*).	(2) (21) (22) (23) (31)
4	LabCyte EPI-MODEL24 SIT	Estudo de validação (2011-2012) baseado nas normas de desempenho (PS) da *Test Guideline* 439 da OCDE (8), que se baseiam nas PS (*) do ECVSM (39) (40).	(24) (25) (26) (27) (28) (35) (39) (40) e PS deste Test Guideline (8) (*)

(*) As normas de desempenho originais do CEVMA (21) foram desenvolvidas em 2007 após a conclusão do estudo de validação prospetivo (16), que avaliou o desempenho dos modelos de ensaio n.º 1 e 2, por referência ao sistema de classificação descrito na 28.ª alteração à Diretiva Substâncias Perigosas da UE (41). Em 2008, foram introduzidos o GHS da ONU (1) e o CRE da UE, que alteraram claramente o valor-limite para a distinção entre substâncias não classificadas e substâncias classificadas de uma pontuação *in vivo* de 2,0 para 2,3. Para se adaptarem a esta nova exigência normativa, os valores da exatidão e a lista de produtos químicos de referência das PS da ECVAM foram atualizados em 2009 (2) (39) (40). Como as PS originais, também as PS atualizadas se basearam, em grande medida, em dados do sobre os produtos químicos de referência do modelo n.º 3 Em 2010, as PS do ECVAM atualizadas foram utilizadas para a elaboração das normas de desempenho relacionadas com a presente *Test Guideline* (8). Para efeitos do presente método de ensaio, o EpiSkin™ é considerado o MRV, por ter sido utilizado para desenvolver todos os critérios das PS. Do documento explicativo ECVAM/BfR, correspondente à *Test Guideline* 439 da OCDE (23), constam informações pormenorizadas sobre os estudos de validação, uma compilação dos dados gerados e as necessárias adaptações das normas de desempenho em consequência da aplicação do sistema GHS da ONU/CRE.

SIT: Ensaio de irritação cutânea

RHE: Epiderme humana reconstruída

▼M8

Apêndice 3

PARÂMETROS DE PROTOCOLO ESPECÍFICOS A CADA UM DOS MODELOS ABRANGIDOS PELO PRESENTE MÉTODO DE ENSAIO

Os modelos de epiderme humana reconstruída apresentam protocolos muito semelhantes; nomeadamente, todos utilizam um período de pós-incubação de 42 horas (32) (33) (34) (35). As principais diferenças dizem respeito a três parâmetros relacionados com as diferentes funções de barreira dos modelos de ensaio, enumerados aqui: A) Tempo e volume de pré-incubação, B) Aplicação de produtos químicos em estudo e C) volume pós-incubação.

	EpiSkin™ (SM)	EpiDerm™ SIT (EPI--200)	SkinEthic >RHE™	LabCyte EPI-MODEL24 SIT
A) Pré-incubação				
Tempo de incubação	18-24 horas	18-24 horas	< 2 horas	15-30 horas
Volume médio	2 ml	0,9 ml	0,3 ou 1 ml	0,5 ml
B) Aplicação do produto químico em estudo				
Para líquidos	10 µl (26 µl/cm^2)	30µl (47 µl/cm^2)	16µl (32 µl/cm^2)	25µl (83 µl/cm^2)
Para sólidos	10 mg (26 mg/cm^2 + DW (5 µl)	25 mg (39 mg/cm^2) + DPBS (25 µl)	16 mg (32 mg/cm^2) + DW (10 µl)	25 mg (83 mg/cm^2) + DW (25 µl)
Utilização de malha de *nylon*	Não utilizada	Se necessário	Aplicada	Não utilizada
Tempo total de aplicação	15 minutos	60 minutos	42 minutos	15 minutos
Temperatura de aplicação	temperatura ambiente	a) à temperatura ambiente durante 25 minutos b) a 37 °C durante 35 minutos	temperatura ambiente	temperatura ambiente
C) Volume pós-incubação				
Volume médio	2 ml	0,9 ml × 2	2 ml	1 ml
D) Variabilidade máxima aceitável				
Desvio-padrão entre os tecidos replicados	DP ≤ 18	DP ≤ 18	DP ≤ 18	DP ≤ 18

TA: Temperatura ambiente
AD: Água destilada
DPBS: Solução-tampão salina de fosfatos Dulbecco

▼**M8**

Apêndice 4

PARÂMETROS FUNDAMENTAIS E CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO PARA A QUALIFICAÇÃO DE UM SISTEMA DE ESPETROFOTOMETRIA HPLC/UPLC PARA A MEDIÇÃO DO MTT FORMAZANO EM EPIDERME HUMANA RECONSTRUÍDA

Parâmetro	Protocolo derivado do documento de orientação da FDA (36) (37)	Critérios de aceitação
Seletividade	Análise do isopropanol, branco vivo (extração de isopropanol de tecidos vivos de epiderme humana reconstruída sem qualquer tratamento), branco morto (extração de isopropanol de tecidos mortos de epiderme humana reconstruída sem qualquer tratamento)	$Area_{interferência} \leq 20$ % of $Area_{LLOQ}$ ([1])
Precisão	Controlos de qualidade (MTT formazano a 1,6 µg/ml, 16 µg/ml e 160 µg/ml) em isopropanol (n = 5)	CV ≤ 15 % ou ≤ 20 % para o LLOQ
Exatidão	Controlos de qualidade em isopropanol (n = 5)	% Dev ≤ 15 % ou ≤ 20 % para LLOQ
Efeito matriz	Controlos de qualidade em branco vivo (n = 5)	85 % ≤ Efeitos matriz % ≤ 115 %
Passagem	Análise de isopropanol após um padrão ULOQ ([2])	$Area_{interference} \leq 20$ % of $Area_{LLOQ}$
Reprodutibilidade (intradiária)	Três curvas de calibração independentes (com base em seis diluições consecutivas de 1/3 de MTT formazano em isopropanol, com início em ULOQ, isto é, 200 µg/ml); Controlos de qualidade em isopropanol (n = 5)	Curvas de calibração: % Dev ≤ 15 % ou ≤ 20 % para LLOQ
Reprodutibilidade (intradiária)	Dia 1: 1 curva de calibração e controlos de qualidade no isopropanol (n = 3) Dia 2: 1 curva de calibração e controlos de qualidade no isopropanol (n = 3) Dia 3: 1 curva de calibração e controlos de qualidade no isopropanol (n = 3)	Controlos de qualidade: % Dev ≤ 15 % e CV ≤ 15 %
Estabilidade a curto prazo do MTT formazano em extratos de tecidos de epiderme humana reconstruída	Controlos de qualidade em branco vivo (n = 3), analisado no dia da preparação e após 24 horas de armazenagem à temperatura ambiente	% Dev ≤ 15 %
Estabilidade a longo prazo do MTT formazano em extratos de tecidos de epiderme humana reconstruída, se necessário	Controlos de qualidade em branco vivo (n = 3), analisado no dia da preparação e após vários dias de armazenagem a uma temperatura especificada (p. ex., 4 °C, — 20 °C, — 80 °C)	% Dev ≤ 15 %

([1]) LLOQ: Limite inferior de quantificação, definido de forma a abranger 1-2 % de viabilidade dos tecidos, ou seja, 0,8 µg/ml.
([2]) ULOQ: Limite superior de quantificação, definido para ser duas vezes superior à mais elevada concentração de MTT formazano em extratos de isopropanol de controlos negativos, isto é, 200 µg/ml.

▼M7

B.47. MÉTODO DE ENSAIO DE OPACIDADE E PERMEABILIDADE DA CÓRNEA EM BOVINOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE PRODUTOS QUÍMICOS INDUTORES DE LESÕES OCULARES GRAVES E DE PRODUTOS QUÍMICOS QUE NÃO NECESSITEM DE SER CLASSIFICADOS EM TERMOS DE IRRITAÇÃO OCULAR NEM DE LESÕES OCULARES GRAVES

INTRODUÇÃO

Este método de ensaio é equivalente ao *Test Guideline* 437 (2013) da OCDE. O método de ensaio de opacidade e permeabilidade da córnea em bovinos (*Bovine Corneal Opacity and Permeability* (BCOP)) foi avaliado em 2006 e 2012 pelo ICCVAM (*Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*), em colaboração com o ECVAM (*European Centre for the Validation of Alternative Methods*) e o JaCVAM (*Japanese Center for the Validation of Alternative Methods*) (1) (2). A primeira avaliação incidiu na utilidade do método BCOP para a identificação de produtos químicos (substâncias e misturas) indutores de lesões oculares graves (1). A segunda avaliação incidiu na utilidade do método para a identificação de produtos químicos (substâncias e misturas) não classificados em termos de irritação ocular nem de lesões oculares graves (2). A base de dados de validação do método BCOP contava com 113 substâncias e 100 misturas (2) (3). Destas avaliações e da correspondente avaliação interpares concluiu-se que este método de ensaio identifica corretamente os produtos químicos (substâncias e misturas) indutores de lesões oculares graves (categoria 1) e os que não necessitam de ser classificados em termos de irritação ocular nem de lesões oculares graves, conforme definição do Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS) da ONU (4) e do Regulamento (CE) n.º 1272/2008, relativo à classificação, rotulagem e embalagem de substâncias e misturas (CRE) ([1]), tendo o método sido considerado cientificamente válido para ambas as finalidades. São lesões oculares graves as lesões produzidas nos tecidos oculares ou uma degradação grave da visão em consequência da aplicação do produto químico em estudo na superfície anterior do olho, não totalmente reversíveis nos 21 dias após a aplicação. Os produtos químicos que induzem lesões oculares graves são classificados na categoria 1 do sistema GHS da ONU. São produtos químicos não classificados em termos de irritação ocular nem de lesões oculares graves os que não preenchem os requisitos de classificação nas categorias 1 ou 2 (2A ou 2B) do sistema de classificação GHS da ONU, ou seja, os ditos de «Nenhuma categoria» no sistema GHS da ONU. O presente método inclui a utilização recomendada e as limitações do método de ensaio BCOP decorrentes das avaliações realizadas. Principais diferenças entre a versão inicial de 2009 e a versão de 2013 do *Test Guideline* da OCDE (enumeração não-exaustiva): utilização do método BCOP na identificação de produtos químicos que não necessitam de ser classificados no sistema GHS da ONU (pontos 2 e 7); clarificação da aplicabilidade do método ao ensaio de álcoois, cetonas e sólidos (pontos 6 e 7) e a substâncias e misturas (ponto 8); clarificação do modo como devem ser ensaiadas as substâncias tensioativas e as misturas que contêm substâncias tensioativas (ponto 28); atualizações e clarificações relativas às amostras de controlo positivas (pontos 39 e 40); atualização dos critérios de decisão do método BCOP (ponto 47); atualização dos critérios de aceitação do estudo (ponto 48); atualização dos elementos a constar dos relatórios dos ensaios (ponto 49); atualização do apêndice 1, relativo às definições; aditamento do apêndice 2, relativo à capacidade de previsão do método BCOP em vários sistemas de classificação; atualização do apêndice 3, relativo à lista de produtos químicos recomendados para demonstração de competência técnica; atualização do apêndice 4, relativo aos suportes de córnea utilizados no método BCOP (ponto 1) e ao opacímetro (pontos 2 e 3).

([1]) Regulamento (CE) n.º 1272/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16 de dezembro de 2008, relativo à classificação, rotulagem e embalagem de substâncias e misturas, que altera e revoga as Diretivas 67/548/CEE e 1999/45/CE, e altera o Regulamento (CE) n.º 1907/2006 (JO L 353 de 31.12.2008, p. 1).

▼M7

É geralmente aceite que, no futuro previsível, não estará disponível nenhum ensaio de irritação ocular *in vitro* único, alternativo ao ensaio ocular *in vivo* pelo método de Draize, para previsões em toda a gama de irritação que cubram as diferentes classes de produtos químicos. Porém, a combinação de vários métodos de ensaio alternativos no âmbito de uma estratégia de ensaio sequencial (por etapas) pode substituir-se ao ensaio ocular pelo método de Draize (5). A abordagem descendente (5) destina-se a ser utilizada quando, com base nas informações disponíveis, for previsível que o produto químico tenha elevado potencial irritante, ao passo que a abordagem ascendente (5) se destina a ser utilizada quando, com base nas informações disponíveis, for previsível que o produto químico não provoque irritação ocular suficiente para que seja necessário classificá-lo. O método de ensaio BCOP é um método *in vitro* que pode ser utilizado em determinadas circunstâncias, respeitadas determinadas limitações, para classificar e rotular produtos químicos em função da perigosidade ocular dos mesmos. Embora não seja considerado, por si só, uma alternativa válida ao ensaio ocular *in vivo* no coelho, o método de ensaio BCOP é recomendado como etapa inicial numa estratégia de ensaio do tipo da abordagem descendente proposta por Scott *et al.* (5) para identificar, sem necessidade de ensaios complementares, produtos químicos indutores de lesões oculares graves, isto é, produtos químicos classificáveis na categoria 1 do sistema GHS da ONU (4). O método BCOP é igualmente recomendado, no âmbito de uma estratégia como a abordagem ascendente (5), para identificar produtos químicos que não necessitem de ser classificados em termos de irritação ocular nem de lesões oculares graves, conforme definido pelo sistema GHS da ONU («nenhuma categoria» nesse sistema) (4). Todavia, se a aplicação do método BCOP a um determinado produto químico não permitir prever se este causa lesões oculares graves ou que não é necessário classificá-lo em termos de irritação ocular nem de lesões oculares graves, o produto químico em causa terá de ser sujeito a ensaios adicionais (*in vitro* e/ou *in vivo*) para determinar a classificação definitiva.

Na descrição deste método de ensaio, pretende-se explicar o processo utilizado para avaliar o potencial de perigosidade ocular de um produto químico, medido pela capacidade deste de induzir opacidade e um aumento de permeabilidade em córneas de bovino isoladas. Medem-se os efeitos tóxicos na córnea do seguinte modo: i) redução da transmissão de luz (opacidade) e ii) aumento da passagem do corante fluoresceína de sódio (permeabilidade). Combinam-se os resultados das determinações de opacidade e de permeabilidade da córnea após exposição ao produto químico em estudo, de modo a obter a pontuação de irritação *in vitro* («*In Vitro* Irritancy Score» IVIS) correspondente, que é utilizada para classificar o nível de irritação causado pelo produto químico.

Estabelecem-se definições no apêndice 1.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES

Este método de ensaio baseia-se no protocolo do método BCOP do ICCVAM (6) (7), inicialmente elaborado a partir de informações baseadas no protocolo do Institute for *in vitro* Sciences (IIVS) e no Protocolo 124 do INVITTOX (8). Este último foi o protocolo utilizado no estudo de prevalidação efetuado em 1997-98 com o patrocínio da Comunidade Europeia. Estes dois protocolos basearam-se no método de ensaio BCOP descrito pela primeira vez por Gautheron *et al*. (9).

O método BCOP pode ser utilizado para identificar produtos químicos indutores de lesões oculares graves, na aceção do sistema GHS da ONU, ou seja, produtos químicos classificáveis na categoria 1 desse sistema (4). Quando utilizado com essa finalidade, a exatidão global do método BCOP é de 79 % (150/191), a taxa de falsos positivos é de 25 % (32/126) e a taxa de falsos negativos é de 14 % (9/65), comparativamente aos dados obtidos pelo método de ensaio ocular *in vivo* no coelho, classificados de acordo com o sistema de classificação GHS da ONU (3) (ver o apêndice 2, quadro 1). Excluindo da base de dados determinados produtos químicos de certas classes químicas (álcoois, cetonas) ou físicas (sólidos), a exatidão global do método BCOP é de 85 % (111/131), a taxa de falsos positivos é de 20 % (16/81) e a taxa de falsos negativos é de 8 % (4/50), no

▼M7

sistema de classificação GHS da ONU (3). A base de dados de validação do método de ensaio BCOP revela que, quando este é utilizado para identificar produtos químicos indutores de lesões oculares graves (categoria 1 do sistema GHS da ONU), o método tem insuficiências potenciais ao nível de taxas de falsos positivos elevadas no caso dos álcoois e das cetonas e de taxas de falsos negativos elevadas no caso dos sólidos (1) (2) (3). Porém, uma vez que o método BCOP não sobreavalia todos os álcoois e cetonas e que a previsão de categoria 1 do sistema GHS da ONU é correta no caso de alguns deles, não se consideram estes dois grupos funcionais orgânicos excluídos do domínio de aplicabilidade do método. Compete ao utilizador do método BCOP decidir se, no caso dos álcoois e cetonas, é aceitável que nem todos os resultados que o indiciem sejam efetivamente positivos ou se são necessários ensaios complementares no âmbito de uma abordagem baseada na ponderação da suficiência da prova. No que respeita à taxa de falsos negativos no caso dos sólidos, importa salientar que os sólidos podem gerar condições de exposição variáveis e extremas no ensaio de irritação ocular *in vivo* pelo método de Draize, que podem falsear as previsões do real potencial de irritação (10). Importa igualmente salientar que, no contexto da identificação de produtos químicos indutores de lesões oculares graves (categoria 1 do sistema GHS da ONU), a nenhum dos falsos negativos identificados na base de dados de validação do ICCVAM (2) (3) esteve associada uma pontuação de irritação *in vitro* (IVIS) igual ou inferior a 3, critério utilizado para identificar os produtos químicos classificados de «nenhuma categoria» no sistema GHS da ONU. Acresce que a obtenção de falsos negativos no método BCOP neste contexto não constitui aspeto crítico, porque os produtos químicos cuja pontuação de irritação *in vitro* seja superior a 3 e inferior ou igual a 55 são em seguida ensaiados por outros métodos *in vitro* adequadamente validados ou, em derradeira opção, no coelho, conforme as exigências normativas, por recurso a uma estratégia de ensaio sequencial baseada na ponderação da suficiência da prova. Atendendo a que a previsão de categoria 1 do sistema GHS da ONU pelo método BCOP é correta no caso de alguns produtos químicos sólidos, também não se considera a fase sólida excluída do domínio de aplicabilidade do método. Os investigadores podem ponderar o recurso a este método de ensaio para todos os tipos de produtos químicos, aceitando uma pontuação de irritação *in vitro* superior a 55 como indicativa de uma reação indutora de lesões oculares graves, merecedora da classificação 1 do sistema GHS da ONU sem necessidade de ensaios complementares. Porém, como referido, os resultados positivos obtidos no caso de álcoois ou cetonas devem ser interpretados com cautela, devido ao risco de não serem efetivamente positivos em todos os casos que o indiciem.

Também pode recorrer-se ao método BCOP para identificar produtos químicos que não necessitem de ser classificados em termos de irritação ocular nem de lesões oculares graves no sistema de classificação GHS da ONU (4). Quando utilizado com essa finalidade, a exatidão global do método BCOP é de 69 % (135/196), a taxa de falsos positivos é de 69 % (61/89) e a taxa de falsos negativos é de 0 % (0/107), comparativamente aos dados obtidos pelo método de ensaio ocular *in vivo* no coelho, classificados de acordo com o sistema de classificação GHS da ONU (3) (ver o apêndice 2, quadro 2). A taxa de falsos positivos obtida (produtos químicos com a classificação *in vivo* «nenhuma categoria» no sistema GHS da ONU, mas com pontuação de irritação *in vitro* superior a 3 — ver o ponto 47) é bastante elevada, mas neste contexto não constitui aspeto crítico, porque os produtos químicos cuja pontuação de irritação *in vitro* seja superior a 3 e inferior ou igual a 55 são seguidamente ensaiados por outros métodos *in vitro* adequadamente validados ou, em derradeira opção, no coelho, conforme as exigências normativas, por recurso a uma estratégia de ensaio sequencial baseada na ponderação da suficiência da prova. O método BCOP não evidencia insuficiências específicas no ensaio de álcoois, cetonas e sólidos quando visa identificar produtos químicos que não necessitem de ser classificados em termos de irritação ocular nem de lesões oculares graves («nenhuma categoria» no sistema GHS da ONU) (3). Os investigadores podem ponderar o recurso a este método de ensaio para todos os tipos de produtos químicos, aceitando um resultado negativo (pontuação de irritação *in vitro* igual ou inferior a 3) como indicativo de que não é necessária nenhuma classificação («nenhuma categoria» no sistema GHS da ONU). Uma vez que o método BCOP só consegue identificar corretamente 31 % dos produtos químicos que não necessitam de ser classificados em termos de irritação ocular nem de lesões oculares graves, este método de ensaio não deve ser privilegiado para iniciar uma abordagem ascendente (5), caso estejam disponíveis outros métodos *in vitro* validados e aceites com sensibilidade igualmente elevada, mas maior especificidade.

▼M7

A base de dados de validação do método BCOP contava com 113 substâncias e 100 misturas (2) (3). Considera-se, portanto, o método BCOP aplicável ao ensaio de substâncias e misturas.

Devido ao número considerável de produtos químicos da categoria 1 do sistema GHS da ONU subclassificados na categoria 2, 2A ou 2B do mesmo sistema e de produtos químicos de «nenhuma categoria» do sistema GHS sobreclassificados na categoria 2, 2A ou 2B desse sistema, não é recomendado o recurso ao método BCOP na identificação de produtos químicos que devam ser classificados de irritantes oculares (categoria 2 ou 2A do sistema GHS da ONU) nem de produtos químicos que devam ser classificados de irritantes oculares moderados (categoria 2B do sistema GHS da ONU) (2) (3). Nesses casos, podem ser necessários ensaios complementares por outro método, que seja adequado.

Na manipulação de olhos e córneas de bovino devem seguir-se as regras e procedimentos estabelecidos no laboratório para a manipulação de matérias de origem animal (tecidos, fluidos biológicos etc.). Recomenda-se a aplicação das precauções gerais inerentes à prática laboratorial (11).

Embora o método BCOP não tenha em conta as lesões na conjuntiva nem na íris, tem em conta os efeitos na córnea, fator principal do sistema de classificação GHS da ONU em função dos efeitos *in vivo*. A reversibilidade das lesões da córnea não pode ser avaliada *per se* pelo método BCOP, pelo que, com base em estudos oculares no coelho, foi proposta a possibilidade de se recorrer à avaliação da profundidade inicial da lesão da córnea para identificar alguns tipos de efeitos irreversíveis (12). São, porém, necessários mais estudos científicos para se compreender a ocorrência de efeitos irreversíveis não associados a lesões iniciais importantes. Finalmente, o método BCOP não permite avaliar o potencial de toxicidade sistémica associado à exposição ocular.

Este método de ensaio será atualizado periodicamente em função de novos dados e informações. Por exemplo, a histopatologia é potencialmente útil quando se necessita de uma caracterização mais completa das lesões da córnea. Conforme é referido no documento de orientações n.º 160 da OCDE (13), incentivam-se os utilizadores a preservarem as córneas e a prepararem espécimes histopatológicos que possam ser utilizados na constituição de uma base de dados e na definição de critérios de decisão utilizáveis na melhoria da exatidão deste método de ensaio.

Os laboratórios que comecem a utilizar este método de ensaio devem recorrer aos produtos químicos para demonstração de competência técnica recomendados no apêndice 3. Antes de apresentarem dados obtidos pelo método BCOP para efeitos da classificação normativa de perigosidade, os laboratórios podem recorrer aos referidos produtos químicos para demonstrar a sua competência técnica na execução deste método.

PRINCÍPIO DO ENSAIO

O método BCOP assenta num modelo organotípico de manutenção *in vitro* das funções fisiológicas e bioquímicas normais da córnea de bovino por um período curto. Neste método de ensaio, as lesões provocadas pelo produto químico em estudo são avaliadas por meio de medições quantitativas, respetivamente com um opacímetro e um espetrofotómetro de luz visível, das alterações de opacidade e permeabilidade da córnea. Ambas as medições são utilizadas para calcular uma IVIS, com base na qual se atribui uma categoria de classificação de perigo de irritação *in vitro*, utilizada como previsão do potencial de irritação ocular *in vivo* do produto químico em estudo (ver os critérios de decisão no ponto 48).

O método BCOP utiliza córneas isoladas retiradas de olhos de bovinos acabados de abater. Determina-se quantitativamente a opacidade da córnea medindo a quantidade de luz transmitida através desta. Determina-se quantitativamente a permeabilidade da córnea medindo a quantidade do corante fluoresceína de sódio que atravessa totalmente a córnea e é detetada no meio de ensaio da câmara posterior. Aplicam-se os produtos químicos em estudo na superfície epitelial da

▼M7

córnea introduzindo-os na câmara anterior do suporte de córnea. Figuram no apêndice 4 uma descrição e um diagrama de um suporte de córnea utilizado no método BCOP. Os suportes de córnea podem ser adquiridos no comércio, de origens diversas, ou podem ser construídos.

Origem e idade dos olhos de bovino e seleção da espécie animal

O gado enviado para os matadouros é normalmente abatido para consumo humano ou outras utilizações comerciais. Só podem ser utilizados na colheita de córneas para o método BCOP animais saudáveis considerados adequados para entrarem na cadeia alimentar humana. Dado que o peso dos bovinos é muito variável, consoante a raça, a idade e o sexo, não se recomenda qualquer peso em concreto do animal no momento do abate.

As córneas podem apresentar variações dimensionais, devido à utilização de olhos de animais de idades diversas. As córneas de bovinos com mais de oito anos têm geralmente um eixo horizontal superior a 30,5 mm e espessura central (CCT) $\geq$ 1 100 μm; as de bovinos com menos de cinco anos têm geralmente um eixo horizontal inferior a 28,5 mm e CCT < 900 μm (14). Por essa razão, não se utilizam habitualmente olhos de bovinos com mais de 60 meses. Normalmente, também não se utilizam olhos de bovinos com menos de doze meses, dado que os olhos se encontram ainda em desenvolvimento e a espessura e o diâmetro da córnea são bastante inferiores aos registados para olhos de gado adulto. Porém, admite-se a utilização de córneas de animais jovens (6 a 12 meses de idade), por haver algumas vantagens, como maior facilidade de obtenção, um intervalo etário estreito e menor risco de exposição dos trabalhadores à encefalopatia espongiforme bovina (BSE) (15). Dado que seria útil avaliar melhor o efeito da dimensão ou espessura da córnea na reação a produtos químicos corrosivas ou irritantes, incentivam-se os utilizadores a indicarem a idade e/ou o peso estimados dos animais de origem das córneas utilizadas no estudo.

Colheita e transporte dos olhos para o laboratório

A colheita dos olhos é efetuada por empregados do matadouro. Para minimizar lesões mecânicas ou outros danos aos olhos, estes devem ser retirados das órbitas o mais rapidamente possível depois da morte e ser refrigerados imediatamente após a enucleação e durante o transporte. Para evitar que os olhos sejam expostos a produtos químicos potencialmente irritantes, os empregados do matadouro não devem utilizar detergentes na lavagem da cabeça do animal.

Utilizando um recipiente de tamanho adequado, mergulham-se os olhos completamente em solução HBSS (*Hanks' Balanced Salt Solution*) refrigerada e transportam-se para o laboratório de uma maneira que minimize a deterioração e contaminações bacteriológicas. Como são colhidos durante o processo de abate, os olhos podem ser expostos a sangue e outras matérias biológicas, incluindo bactérias e outros microrganismos. Importa, pois, minimizar o risco de contaminação (por exemplo mantendo o recipiente dos olhos em gelo fundente durante a colheita e o transporte e adicionando antibióticos — tais como penicilina a 100 UI/ml e estreptomicina a 100 μg/ml — ao HBSS no qual se mergulham os olhos durante o transporte).

O intervalo entre a colheita dos olhos e a utilização das córneas no método BCOP deve ser mínimo (normalmente, os olhos devem ser colhidos e utilizados no mesmo dia) e não deve, comprovadamente, comprometer os resultados do ensaio. Os resultados dos ensaios estão relacionados com os critérios de seleção dos olhos e com as reações às amostras de controlo positivas e negativas. Os olhos utilizados num ensaio devem ser todos do mesmo grupo de colheita num determinado dia.

Critérios de seleção dos olhos utilizados no método BCOP

Uma vez chegados ao laboratório, examinam-se cuidadosamente os olhos para detetar eventuais defeitos, nomeadamente aumento de opacidade, escoriações e neovascularização. Só podem ser utilizadas córneas de olhos sem estes defeitos.

▼M7

Também se avalia a qualidade da córnea em fases posteriores do ensaio. Descartam-se as córneas que, após um período inicial de uma hora para estabelecimento do equilíbrio, apresentem opacidade superior a sete unidades, ou opacidade equivalente para o opacímetro e os suportes de córnea utilizados (*NOTA:* calibrar o opacímetro com os padrões de opacidade utilizados para estabelecer as unidades de opacidade — ver o apêndice 4).

Cada grupo de tratamento (produto químico em estudo e amostras de controlo positivas e negativas ensaiadas em paralelo) é constituído por um mínimo de três olhos. Utilizam-se três córneas para amostras de controlo negativas de córnea no método de ensaio BCOP. Como as córneas são excisadas do globo ocular e colocadas nas câmaras, há potencial para a ocorrência de artefactos resultantes da manipulação, com incidência nos valores individuais de opacidade e permeabilidade da córnea (incluindo as amostras de controlo negativas). Os valores de opacidade e permeabilidade das córneas das amostras de controlo negativas são utilizados para corrigir os valores de opacidade e permeabilidade da córnea correspondentes ao produto químico em estudo e às amostras tratadas para controlo positivo utilizados no cálculo da IVIS.

PROTOCOLO DE ENSAIO

Preparação dos olhos

Dissecam-se córneas sem defeitos, deixando uma orla de 2-3 mm de esclerótica, para facilitar o manuseamento, e tomando as precauções necessárias para não danificar o epitélio e o endotélio da córnea. Coloca-se cada córnea num suporte especialmente concebido, constituído por um compartimento anterior e um compartimento posterior. O primeiro estabelece uma interface com a superfície epitelial da córnea; o segundo, com a superfície endotelial da mesma. Enchem-se as duas câmaras, até transbordar, com Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) isento de vermelho de fenol, previamente aquecido, começando pela câmara posterior e evitando a formação de bolhas. Coloca-se em seguida a dispositivo à temperatura de 32 ± 1 °C durante, pelo menos, uma hora, para que as córneas fiquem em equilíbrio com o meio e, tanto quanto possível, readquiram a sua atividade metabólica normal (a temperatura aproximada da superfície da córnea *in vivo* é de 32 °C).

Terminado o período previsto para se atingir o equilíbrio, adiciona-se EMEM isento de vermelho de fenol fresco pré-aquecido a ambas as câmaras e efetua-se a leitura da linha de base de opacidade para cada córnea. Descartam-se as córneas que evidenciem lesões macroscópicas nos tecidos (por exemplo escoriações, pigmentação ou neovascularização), opacidade superior a 7 unidades ou opacidade equivalente para o opacímetro e os suportes de córnea utilizados. Selecionam-se, para córneas de controlo negativas (ou de controlo do solvente), pelo menos três córneas. Distribuem-se a seguir as córneas restantes em dois grupos: córneas a submeter ao tratamento e córneas de controlo positivo.

Dado que a sua capacidade calorífica é superior à do ar, a água oferece condições de temperatura mais estáveis para incubação. Recomenda-se, portanto, a utilização de um banho-maria para manter o suporte de córnea e o seu conteúdo a 32 ± 1 °C. Admite-se, porém, a utilização de incubadores a ar, tomando as precauções necessárias para manter a temperatura estável (por exemplo aquecendo previamente os suportes e o meio de ensaio).

Aplicação do produto químico em estudo

Utiliza-se um protocolo de tratamento para líquidos e agentes tensioativos (sólidos ou líquidos) e outro para sólidos não-tensioativos.

Os líquidos são ensaiados sem diluição. Os semissólidos, cremes e ceras são normalmente ensaiados como se fossem líquidos. As substâncias tensioativas são ensaiadas à concentração de 10 % (m/v) numa solução a 0,9 % de cloreto de sódio, em água destilada ou noutro solvente comprovadamente sem efeitos adversos no sistema de ensaio. É necessário justificar convenientemente o recurso a outra diluição. As misturas que contenham agentes tensioativos podem ser

▼M7

ensaiadas sem diluição ou diluídas a uma concentração que se adeque ao cenário de exposição *in vivo* em causa. É necessário justificar convenientemente as concentrações ensaiadas. Expõem-se as córneas aos líquidos e aos agentes tensioativos durante 10 minutos. Se forem utilizados tempos de exposição diferentes, será necessário justificá-lo em termos científicos. Ver no apêndice 1 as definições de agente tensioativo e de mistura com agentes tensioativos.

Os sólidos não-tensioativos são normalmente ensaiados em solução ou suspensão, à concentração de 20 % (m/v), numa solução a 0,9 % de cloreto de sódio, em água destilada ou noutro solvente comprovadamente sem efeitos adversos no sistema de ensaio. Em determinadas circunstâncias e mediante justificação científica adequada, também pode ensaiar-se um sólido tal e qual, mediante aplicação direta na superfície da córnea pelo método da câmara aberta (ponto 32). Expõem-se as córneas aos sólidos durante quatro horas, mas, tal como no caso dos líquidos e dos produtos tensioativos, podem utilizar-se tempos de exposição diferentes, a justificar em termos científicos.

Podem ser utilizados diversos métodos de tratamento, consoante a natureza física e as características químicas do produto químico em estudo (sólidos, líquidos, líquidos viscosos ou não-viscosos etc.). O aspeto crítico é garantir que o produto químico cobre adequadamente a superfície epitelial e é adequadamente removido na fase de lavagem. Utiliza-se normalmente um método de câmara fechada para o ensaio de líquidos não-viscosos ou ligeiramente viscosos e um método de câmara aberta para o ensaio de líquidos semiviscosos ou viscosos, bem como para sólidos aplicados diretamente.

No método da câmara fechada, introduz-se na câmara anterior, através dos orifícios de dosagem existentes na parte de cima desta, uma quantidade do produto químico em estudo suficiente para cobrir a superfície epitelial da córnea (750 µl), fechando em seguida os orifícios com as respetivas tampas durante a exposição. É importante que cada córnea seja exposta ao produto químico em estudo durante o período adequado.

No método da câmara aberta, removem-se, antes do tratamento, a janela de vidro e o anel de fixação da janela da câmara anterior. Com uma micropipeta, aplica-se o produto químico em estudo ou de controlo diretamente na superfície epitelial da córnea (750 µl ou um volume do produto químico em estudo suficiente para cobrir completamente a córnea). Se for difícil pipetá-lo, o produto químico em estudo pode ser introduzido sob pressão numa pipeta volumétrica, para facilitar a dosagem. Para que a matéria em causa possa ser introduzida sob pressão na ponta da pipeta volumétrica, insere-se esta ponta na extremidade da seringa. Pressiona-se o êmbolo da seringa e, simultaneamente, puxa-se o pistão da pipeta para cima. Caso se formem bolhas de ar na ponta da pipeta, remove-se (expulsa-se) o produto químico em estudo e repete-se o processo, até a ponta da pipeta ficar cheia, sem bolhas de ar. Se necessário, pode utilizar-se uma seringa normal (sem agulha), pois permite medir um volume exato do produto químico em estudo e facilita a aplicação na superfície epitelial da córnea. Depois da dosagem, recoloca-se a janela de vidro na câmara anterior, para recriar um sistema fechado.

Incubação após a exposição

Após o período de exposição, removem-se da câmara anterior o produto químico em estudo, a amostra de controlo negativa ou o produto químico de controlo positivo e lava-se o epitélio pelo menos três vezes (ou até deixar de se ver produto químico em estudo) utilizando EMEM com vermelho de fenol. Utiliza-se na lavagem meio de ensaio com vermelho de fenol, porque pode seguir-se a evolução cromática do vermelho de fenol para determinar a eficácia de lavagem de produtos químicos ácidos ou alcalinos. Lavam-se as córneas mais de três vezes se a cor do vermelho de fenol continuar alterada (amarelo ou púrpura)

▼M7

ou o produto químico em estudo ainda for visível. Quando o meio já não contiver o produto químico em estudo, lavam-se as córneas uma última vez utilizando EMEM sem vermelho de fenol, para garantir a remoção deste último da câmara anterior antes da medição de opacidade. Volta então a encher-se a câmara anterior com EMEM fresco sem vermelho de fenol.

No caso dos líquidos ou dos agentes tensioativos, após a lavagem, incubam-se as córneas durante mais duas horas a 32 ± 1 °C. Em determinadas circunstâncias, pode ser útil um tempo de incubação mais longo depois da exposição, a ponderar caso a caso. As córneas tratadas com sólidos são bem lavadas no final do período de exposição de quatro horas, mas não é necessária incubação suplementar.

Regista-se a opacidade e a permeabilidade de cada córnea logo que terminar o período de incubação após a exposição, no caso dos líquidos e dos agentes tensioativos, ou o período de exposição de quatro horas, no caso dos sólidos não-tensioativos. Examina-se ainda visualmente cada córnea e registam-se as observações pertinentes (descamação de tecidos, resíduos do produto químico em estudo, perfil de opacidade não-uniforme etc.). Estas observações podem ser importantes, pois são passíveis de se traduzirem em variações nas leituras do opacímetro.

Produtos químicos de controlo

Em cada ensaio ensaiam-se em paralelo amostras de controlo positivas e negativas (ou do solvente/excipiente).

Ao ensaiar pelo método BCOP substâncias líquidas a 100 %, ensaia-se em paralelo uma amostra de controlo negativa (por exemplo solução a 0,9 % de cloreto de sódio ou água destilada), para possibilitar a deteção de alterações inespecíficas do sistema de ensaio e estabelecer uma linha de base para os parâmetros a determinar no ensaio. Essa amostra de controlo visa igualmente evitar que as condições do ensaio provoquem, inadequadamente, uma reação de irritação.

Ao ensaiar líquidos diluídos, agentes tensioativos ou sólidos, inclui-se no método BCOP um grupo paralelo de amostras de controlo do excipiente/solvente, para possibilitar a deteção de alterações inespecíficas do sistema de ensaio e estabelecer uma linha de base para os parâmetros a determinar no ensaio. Só podem utilizar-se solventes/excipientes que, comprovadamente, não tenham efeitos adversos no sistema de ensaio.

Para verificar a integridade e o bom funcionamento do sistema de ensaio, inclui-se em cada ensaio um produto químico que reconhecidamente induza reação positiva, para servir de amostra de controlo positiva paralela. Porém, para que possa determinar-se a variabilidade no tempo da reação à referida amostra de controlo positiva, a reação de irritação não deve ser excessivamente forte.

Como amostras de controlo positivas para produtos químicos em estudo líquidos, podem ser utilizados, por exemplo, etanol a 100 % e dimetilformamida a 100 %. Como amostra de controlo positiva para produtos químicos em estudo sólidos, pode utilizar-se, por exemplo, uma solução a 0,9 % de cloreto de sódio com 20 % (m/v) de imidazole.

Os produtos químicos de referência são úteis para avaliar o potencial de irritação ocular de produtos químicos desconhecidos de uma determinada classe química ou classe de produtos, ou para avaliar o potencial de irritação relativo de um irritante ocular numa determinada gama de reações de irritação.

Parâmetros medidos

Determina-se a opacidade com base na quantidade de luz transmitida através da córnea. Determina-se quantitativamente a opacidade da córnea medindo-a com um opacímetro numa escala contínua de valores de opacidade.

Determina-se a permeabilidade com base na quantidade do corante fluoresceína de sódio que penetra em todas as camadas celulares da córnea (ou seja, desde o epitélio da superfície exterior da córnea até ao endotélio da sua superfície interior). Coloca-se 1 ml de solução de fluoresceína de sódio (4 ou 5 mg/ml, consoante se ensaiem líquidos ou agentes tensioativos, por um lado, ou sólidos não-tensioativos, por outro) na câmara anterior do suporte de córnea, que estabelece interface com a superfície epitelial da córnea. Enche-se com EMEM fresco a câmara posterior, que estabelece interface com a superfície endotelial da córnea. Incuba-se a seguir o suporte, em posição horizontal, durante 90 ± 5 minutos, a 32 ± 1 °C. Determina-se quantitativamente, por espetrofotometria UV/VIS, a

▼M7

quantidade de fluoresceína de sódio que atravessa a córnea para a câmara posterior. Os valores das medições espetrofotométricas a 490 nm são registados numa escala contínua de absorvência ou densidade ótica (DO_{490}). Determinam-se os valores de permeabilidade à fluoresceína utilizando os valores de DO_{490} obtidos com um espectrofotómetro de luz visível num percurso ótico normalizado de 1 cm.

Em alternativa, pode utilizar-se um dispositivo de leitura constituído por uma placa de microtitulação de 96 alvéolos, desde que: i) seja possível estabelecer uma gama de linearidade do leitor de placa para a determinação de valores de DO_{490} da fluoresceína; ii) se utilize na placa de 96 alvéolos o volume de amostras de fluoresceína que permite obter corretamente valores de DO_{490} equivalentes aos obtidos com o percurso ótico normalizado de 1 cm (normalmente 360 µl, podendo ser necessário encher completamente os alvéolos).

DADOS E RELATÓRIOS

Avaliação dos dados

Depois de se corrigirem os valores de opacidade e de permeabilidade média (DO_{490}) em função dos valores da opacidade de fundo e da permeabilidade (DO_{490}) correspondente à amostra de controlo negativa, combinam-se numa fórmula empírica os valores médios de opacidade e de permeabilidade (DO_{490}) correspondentes a cada grupo de tratamento, a fim de calcular a respetiva pontuação de irritação *in vitro* (IVIS), do seguinte modo:

IVIS = valor médio de opacidade + 15 × valor médio de permeabilidade (DO_{490})

Sina *et al.* (16) referiram que esta fórmula foi estabelecida com base em estudos no seu laboratório e interlaboratoriais. A fim de determinar a equação que melhor correlacionava os dados *in vivo* e *in vitro*, fez-se uma análise multivariada dos dados obtidos num estudo multilaboratorial de uma série de 36 compostos. Essa análise foi efetuada por cientistas de duas empresas distintas, que chegaram a duas equações praticamente idênticas.

Os valores de opacidade e de permeabilidade devem ser também avaliados independentemente uns dos outros, para determinar se o produto químico em estudo induz corrosividade ou irritação severa com base em apenas um dos dois parâmetros medidos (ver «Critérios de decisão»).

Critérios de decisão

Seguem-se os valores-limite de pontuação de irritação *in vitro* (IVIS) para a identificação de produtos químicos indutores de lesões oculares graves (categoria 1 do sistema GHS da ONU) e de produtos químicos que não necessitem de ser classificados em termos de irritação ocular nem de lesões oculares graves («nenhuma categoria» do sistema GHS da ONU):

IVIS	Sistema GHS da ONU
≤ 3	Nenhuma categoria
> 3; ≤ 55	Nenhuma previsão possível
> 55	Categoria 1

Critérios de aceitação do estudo

Considera-se o ensaio aceitável se a IVIS correspondente à amostra de controlo positiva não se desviar da média histórica vigente mais que o dobro do desvio-padrão. Essa média deve ser atualizada pelo menos de três em três meses ou sempre que se efetue um ensaio aceitável num laboratório que proceda a estes ensaios com pouca frequência (menos de uma vez por mês). Os valores de opacidade e permeabilidade correspondentes às amostras de controlo negativas e do solvente/excipiente devem ser inferiores aos limites superiores estabelecidos para os valores de opacidade e permeabilidade de fundo de córneas de bovino tratadas com os respetivos amostra de controlo negativa e solvente/excipiente.

▼M7

Quando a classificação do produto químico em estudo é inequívoca, basta normalmente uma série de ensaios constituída por, pelo menos, três córneas. Porém, nos casos de resultados inconclusivos na primeira série de ensaios, é de ponderar (mas não necessariamente exigível) a realização de uma segunda série de ensaios, e até de uma terceira se os resultados médios da IVIS das duas primeiras séries forem discordantes. Neste contexto, considera-se inconclusivo o resultado da primeira série de ensaios se as previsões referentes às três córneas não forem concordantes, do seguinte modo:

— as previsões referentes a duas das três córneas são discordantes da média correspondente às três córneas; OU

— a previsão referente a uma das três córneas é discordante da média correspondente às três córneas E o resultado discordante difere mais de 10 unidades de IVIS do valor-limite de 55.

— Se a repetição da série de ensaios corroborar a previsão da série de ensaios inicial (em termos de valor médio da IVIS), pode ser tomada uma decisão final sem necessidade de ensaios complementares. Se a repetição da série de ensaios não corroborar a previsão da série de ensaios inicial (em termos de valor médio da IVIS), deve realizar-se uma terceira e derradeira série de ensaios, para resolver as previsões equívocas e classificar o produto químico em estudo. Se de alguma série de ensaios resultar uma previsão de categoria 1 do sistema GHS da ONU, pode dispensar-se a realização de ensaios complementares para classificação e rotulagem.

Relatório do ensaio

O relatório do ensaio deve incluir os seguintes elementos que tenham pertinência na realização do estudo em causa:

Produtos químicos em estudo e de controlo

— Denominação(ões) química(s), como a denominação estrutural utilizada pelo *Chemical Abstracts Service* (CAS), seguida de outras denominações, se existirem; número de registo CAS, se conhecido;

— Grau de pureza e composição do produto químico em estudo/de controlo (em percentagem ponderal), se conhecidos;

— Propriedades físico-químicas (por exemplo: estado físico, volatilidade, pH, estabilidade, classe química, hidrossolubilidade) relevantes para a realização do estudo;

— Pré-tratamento dos produtos químicos em estudo/de controlo, se for o caso (aquecimento ou moagem, por exemplo);

— Estabilidade, se conhecida.

Informações relativas ao patrocinador e ao laboratório

— Nome e endereço do patrocinador, do laboratório e do diretor do estudo.

Condições do método de ensaio

— Opacímetro utilizado (modelo e especificações, por exemplo) e regulações desse instrumento;

— Informações sobre a calibração dos dispositivos utilizados para medir a opacidade e a permeabilidade (por exemplo: opacímetro e espectrofotómetro), que garantam a linearidade das medições;

— Tipo de suportes de córnea utilizado (modelo e especificações, por exemplo);

▼M7

— Descrição de outros equipamentos utilizados;

— Processo utilizado para garantir a integridade (exatidão e fiabilidade) do método de ensaio ao longo do tempo (por exemplo: ensaio periódico dos produtos químicos recomendados para demonstração de competência técnica).

Critérios de aceitação do ensaio

— Amostras de controlo positivas e negativas ensaiadas em paralelo, situadas num intervalo aceitável, com base nos dados históricos;

— Se for aplicável, intervalos aceitáveis das amostras de referência de controlo ensaiadas em paralelo, com base nos dados históricos.

Colheita e preparação dos olhos

— Indicação da origem dos olhos (ou seja, da instalação na qual foram colhidos);

— Diâmetro das córneas, relacionado com a idade dos animais donde provêm e uma medida da adequação destes para o ensaio;

— Condições de armazenagem e de transporte dos olhos (data-hora da colheita dos olhos, tempo decorrido até ao início dos ensaios, meios de transporte e condições de temperatura durante o transporte, antibióticos eventualmente utilizados etc.);

— Preparação e montagem das córneas de bovino, incluindo informações sobre a qualidade das córneas, a temperatura dos suportes de córnea e os critérios de seleção das córneas utilizadas no ensaio.

Protocolo de ensaio

— Número de replicados utilizados;

— Identificação das amostras de controlo negativa e positiva utilizadas (e das amostras de controlo de referência e do solvente, se for caso disso);

— Concentração(ões) do produto químico em estudo, aplicação deste, tempo de exposição e tempo de incubação após a exposição;

— Descrição dos critérios de avaliação e de decisão utilizados;

— Descrição dos critérios de aceitação do estudo utilizados;

— Descrição de eventuais modificações ao protocolo do ensaio;

— Descrição dos critérios de decisão utilizados.

Resultados

— Quadro dos resultados correspondentes a cada amostra em estudo (por exemplo: valores de opacidade e de DO_{490} e valor calculado da IVIS para o produto químico em estudo e para as amostras de controlo positivas, negativas e de referência (se for o caso), sob a forma de quadro, incluindo os dados correspondentes aos replicados efetuados, e médias ± desvio-padrão para cada ensaio);

— Descrição de outros efeitos eventualmente observados;

— Classificação *in vitro* segundo o sistema GHS da ONU, se for o caso.

Discussão dos resultados

Conclusões

▼**M7**

REFERÊNCIAS

1) ICCVAM (2006). Test Method Evaluation Report — *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Disponível em: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm].

2) ICCVAM (2010). ICCVAM Test Method Evaluation Report: Current Validation Status of *In Vitro* Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products. NIH Publication No.: 10-7553. Research Triangle Park, NC. National Institute of Environmental Health Sciences. Disponível em: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm].

3) OCDE (2013). Streamlined Summary Document supporting the Test Guideline 437 for eye irritation/corrosion. Series on Testing and Assessment, No.189. OCDE, Paris.

4) ONU (2011). Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos da ONU (GHS), ST/SG/AC.10/30 — Rev. 4. Nova Iorque e Genebra: Nações Unidas. Disponível em: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev04/04files_e.html].

5) Scott, L., Eskes, C., Hoffmann, S., Adriaens, E., Alépée, N., Bufo, M., Clothier, R., Facchini, D., Faller, C., Guest, R., Harbell, J., Hartung, T., Kamp, H., Le Varlet, B., Meloni, M., McNamee, P., Osborne, R., Pape, W., Pfannenbecker, U., Prinsen, M., Seaman, C., Spielman, H., Stokes, W., Trouba, K., Van den Berghe, C., Van Goethem, F., Vassallo, M., Vinardell, P., Zuang, V. (2010). A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace *in vivo* studies using Bottom-Up and Top-Down approaches. *Toxicol. in Vitro*, 24:1-9.

6) ICCVAM (2006). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. *In*: ICCVAM Test Method Evaluation Report — *in vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Disponível em: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm].

7) Pontuações de eritemaICCVAM (2010). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. *In*: ICCVAM Test Method Evaluation Report — Current Validation Status of *In Vitro* Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 10-7553A. Disponível em: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm.

8) INVITTOX (1999). Protocol 124: Bovine Corneal Opacity and Permeability Assay — SOP of Microbiological Associates Ltd. Ispra, Itália: Centro Europeu de validação de métodos alternativos (ECVAM).

9) Gautheron, P., Dukic, M., Alix, D., Sina, J.F. (1992) Bovine corneal opacity and permeability test: An *in vitro* assay of ocular irritancy. *Fundam. Appl. Toxicol.,* 18:442-449.

10) Prinsen, M.K. (2006). The Draize Eye Test and *in vitro* alternatives; a left-handed marriage? *Toxicol. in Vitro*, 20:78-81.

11) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Disponível em: [http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf].

▼**M7**

12) Maurer, J.K., Parker, R.D., Jester, J.V. (2002). Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. *Reg. Tox. Pharmacol.,* 36:106-117.

13) OCDE (2011). Guidance Document on The Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) and Isolated Chicken Eye (ICE) Test Methods: Collection of Tissues for Histological Evaluation and Collection of Data on Non-severe Irritants. Series on Testing and Assessment, No. 160. Adoptado em 25 de outubro de 2011. Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Económicos (OCDE), Paris.

14) Doughty, M.J., Petrou, S., Macmillan, H. (1995). Anatomy and morphology of the cornea of bovine eyes from a slaughterhouse. *Can. J. Zool.*, 73:2159-2165.

15) Collee, J., Bradley, R. (1997). BSE: A decade on — Part I. The Lancet, 349:636-641.

16) Sina, J.F., Galer, D.M., Sussman, R.S., Gautheron, P.D., Sargent, E.V., Leong, B., Shah, P.V., Curren, R.D., Miller, K. (1995). A collaborative evaluation of seven alternatives to the Draize eye irritation test using pharmaceutical intermediates. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 26:20-31.

17) Capítulo B.5 deste anexo, «Irritação/corrosão ocular agudas».

18) ICCVAM (2006). Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method. NIH Publication No.: 06-4512. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Disponível em: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm].

19) OCDE (1998). Series on Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring, No. 1. OECD Principles on Good Laboratory Practice (revisto em 1997).

Disponível em: http://www.oecd.org/document/63/0,3343,en_2649_34381_2346175_1_1_1_1,00.html

▼M7

Apêndice 1

DEFINIÇÕES

Exatidão: Grau de acordo entre os resultados do método de ensaio e os valores de referência aceites. Constitui uma medida da eficiência do método e um dos aspetos da «adequação». Este termo e o termo «concordância» são muitas vezes utilizados indistintamente para indicar a proporção de resultados corretos do método de ensaio.

Produto químico de referência: Produto químico utilizado como padrão de comparação com o produto químico em estudo. Deve ter as seguintes propriedades: i) origem ou origens uniformes e fiáveis; ii) similaridade estrutural e funcional com a classe de produtos químicos em estudo; iii) características físico-químicas conhecidas; iv) disponibilidade de dados sobre os efeitos conhecidos; v) potência conhecida situada na gama de reação pretendida.

Abordagem ascendente: Metodologia por etapas utilizada para produtos químicos que se pense não necessitarem de ser classificados em termos de irritação ocular nem de lesões oculares graves; inicia-se com a determinação de produtos químicos que não careçam de classificação (resultado negativo) a partir de outros produtos químicos (resultado positivo).

Produto químico: Substância ou mistura.

Córnea: Parte anterior transparente do globo ocular que recobre a íris e a pupila e deixa passar a luz para o interior.

Opacidade da córnea: Medida do grau de opacidade da córnea depois de exposta ao produto químico em estudo. Um aumento de opacidade da córnea é indicador de lesão da córnea. A opacidade pode ser avaliada subjetivamente, como no ensaio ocular no coelho pelo método de Draize, ou objetivamente, utilizando um instrumento como um «opacímetro».

Permeabilidade da córnea: Medição quantitativa da lesão epitelial da córnea por determinação da quantidade do corante fluoresceína de sódio que atravessa todas as camadas celulares da córnea.

Irritação ocular: Alterações oculares em consequência da aplicação do produto químico em estudo na superfície anterior do olho, totalmente reversíveis nos 21 dias após a aplicação. Este termo e os termos «efeitos oculares reversíveis» ou «categoria 2 do sistema GHS da ONU» (4) são utilizados indistintamente.

Taxa de falsos negativos: Proporção dos produtos químicos positivos que o método de ensaio considera, erradamente, negativos. É um dos indicadores da eficiência dos métodos de ensaio.

Taxa de falsos positivos: Proporção dos produtos químicos negativos que o método de ensaio considera, erradamente, positivos. É um dos indicadores da eficiência dos métodos de ensaio.

Perigo: Propriedade intrínseca de um agente ou de uma situação, suscetível de causar efeitos adversos num organismo, sistema ou (sub)população que seja exposto ao agente em causa.

Pontuação de irritação *in vitro* (IVIS): Fórmula empírica, utilizada no método de ensaio BCOP, que combina os valores médios de opacidade e de permeabilidade referentes a um grupo de tratamento numa pontuação *in vitro* única para esse grupo. IVIS = valor médio de opacidade + 15 × valor médio de permeabilidade.

Efeitos oculares irreversíveis: Ver «Lesões oculares graves».

▼M7

Mistura: Mistura ou solução constituída por duas ou mais substâncias que nela não reagem (4).

Amostra de controlo negativa: Replicado não-tratado que contém todos os componentes do sistema de ensaio. Esta amostra é ensaiada juntamente com as amostras tratadas com o produto químico em estudo e as outras amostras de controlo, para determinar se o solvente interage com o sistema de ensaio.

Não-classificado: Produtos químicos não classificados em termos de irritação ocular (categorias 2, 2A ou 2B do sistema GHS da ONU) nem de lesões oculares graves (categoria 1 do sistema GHS da ONU). Designação utilizada indistintamente com a classificação «nenhuma categoria no sistema GHS da ONU».

Opacímetro: Instrumento utilizado para medir a «opacidade da córnea» por determinação quantitativa da luz transmitida através da córnea. Normalmente, o instrumento tem dois compartimentos, dispondo cada um deles de uma fonte luminosa e de uma célula fotoelétrica. Um compartimento é utilizado para a córnea tratada e o outro para calibrar o instrumento e regular o zero deste. Envia-se luz de uma lâmpada de halogéneo, através de um compartimento de controlo (câmara vazia, sem janelas nem líquido), para uma célula fotoelétrica e compara-se com a luz igualmente enviada para uma célula fotoelétrica através do compartimento experimental, que compreende a câmara na qual se colocou a córnea. O dispositivo compara a luz transmitida para as células fotoelétricas, determina a diferença e exibe o valor numérico da opacidade num visor digital.

Amostra de controlo positiva: Replicado que contém todos os componentes do sistema de ensaio e foi tratado com um produto químico que comprovadamente induz reação positiva. Para que possa determinar-se a variabilidade, ao longo do tempo, da reação a esta amostra de controlo, essa reação não deve ser excessivamente forte.

Efeitos oculares reversíveis: Ver «irritação ocular».

Fiabilidade: Medida em que, utilizando o mesmo protocolo, um método de ensaio pode ser continuadamente reproduzido no mesmo laboratório e em laboratórios diferentes. A fiabilidade é avaliada com base nos valores calculados das reprodutibilidades intralaboratorial e interlaboratorial, bem como da repetibilidade intralaboratorial.

Lesões oculares graves: Lesão do tecido ocular ou degradação grave da visão em consequência da aplicação do produto químico em estudo na superfície anterior do olho, não totalmente reversível nos 21 dias após a aplicação. Este termo e os termos «efeitos oculares irreversíveis» ou «categoria 1 do sistema GHS da ONU» (4) são utilizados indistintamente.

Amostra de controlo do solvente/excipiente: Amostra não-tratada que contém todos os componentes do sistema de ensaio, incluindo o solvente ou excipiente, e é ensaiada, juntamente com as amostras tratadas com o produto químico em estudo e as outras amostras de controlo, para estabelecer a linha de base de reação para as amostras tratadas com o produto químico em estudo, dissolvido no mesmo solvente ou excipiente. Quando ensaiada em paralelo com uma amostra de controlo negativa, esta amostra também permite determinar se o solvente ou excipiente interage com o sistema de ensaio.

Substância: Elemento químico ou composto de um elemento químico no estado natural ou obtido por qualquer processo de produção, incluindo qualquer aditivo necessário para preservar a estabilidade do produto e qualquer impureza derivada do processo utilizado, mas excluindo solventes que possam ser separados sem afetar a estabilidade da substância nem lhe modificar a composição (4).

▼M7

Agente tensioativo: Substância, como um detergente, capaz de reduzir a tensão superficial de líquidos, permitindo-lhes formar espumas ou penetrar em sólidos; igualmente designado por «agente molhante».

Mistura com agentes tensioativos: No contexto deste método de ensaio, é uma mistura que contém um ou mais agentes tensioativos em concentração final superior a 5 %.

Abordagem descendente: Metodologia por etapas utilizada para produtos químicos que se suspeite causarem lesões oculares graves; inicia-se com a determinação de produtos químicos que induzam lesões oculares graves (resultado positivo) a partir de outros produtos químicos (resultado negativo).

Produto químico em estudo: Qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado este método de ensaio.

Estratégia de ensaio sequencial por etapas: Estratégia sequencial de ensaio em que, seguindo uma ordem estabelecida, se avalia toda a informação disponível sobre o produto químico em estudo, por um processo baseado na ponderação da suficiência da prova em cada etapa, com o objetivo de determinar se há informação suficiente para uma decisão de classificação de perigosidade antes de passar à etapa seguinte. Se a informação existente possibilitar a atribuição de um potencial de irritação ao produto químico em estudo, não serão necessários mais ensaios. Se a informação existente não possibilitar a atribuição de um potencial de irritação ao produto químico em estudo, procede-se a uma série de ensaios sequenciais em animais até ser possível atribuir uma classificação inequívoca.

Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS): Sistema (designado em inglês por *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals*) que propõe a classificação dos produtos químicos (substâncias e misturas) em função de tipos e níveis normalizados de perigos físicos, sanitários e ambientais e trata ainda dos elementos de comunicação correspondentes, como pictogramas, palavras-sinal, advertências de perigo, recomendações de prudência e fichas de dados de segurança, de modo a transmitir informações sobre os efeitos indesejáveis do produto em causa, com vista à proteção das pessoas (empregadores, trabalhadores, transportadores, consumidores, pessoal dos serviços de emergência etc.) e do ambiente (4).

Categoria 1 do sistema GHS da ONU: Ver «Lesões oculares graves».

Categoria 2 do sistema GHS da ONU: Ver «irritação ocular».

Nenhuma categoria no sistema GHS da ONU: Produtos químicos que não preenchem os requisitos da classificação nas categorias 1 ou 2 (2A ou 2B) do sistema GHS da ONU. Este termo e o termo «não-classificado» são utilizados indistintamente.

Método de ensaio validado: Método de ensaio relativamente ao qual foram concluídos estudos de validação com vista a determinar a sua adequação (incluída a exatidão) e a sua fiabilidade para um determinado fim. Importa referir que um método de ensaio validado pode não ser suficientemente exato e fiável para se considerar aceitável para o fim pretendido.

Ponderação da suficiência da prova: Processo que consiste em ponderar os pontos fortes e os pontos fracos dos vários elementos de informação para tirar conclusões fundamentadas sobre o potencial de perigosidade do produto químico.

▼M7

Apêndice 2

CAPACIDADE DE PREVISÃO DO MÉTODO DE ENSAIO BCOP

Quadro 1

Capacidade de previsão do método BCOP na identificação de produtos químicos indutores de lesões oculares graves [categoria 1 ou não (categoria 2 + nenhuma categoria) no sistema GHS da ONU/CRE da UE; categoria I ou não (categoria II + categoria III + categoria IV) no sistema EPA dos E.U.A.].

Sistema de classificação	N.º	Exatidão		Sensibilidade		Falsos negativos		Especificidade		Falsos positivos	
		%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º
Sistema GHS da ONU Sistema CRE da UE	191	78,53	150/191	86,15	56/65	13,85	9/65	74,60	94/126	25,40	32/126
Sistema EPA dos E.U.A.	190	78,95	150/190	85,71	54/63	14,29	9/63	75,59	96/127	24,41	31/127

Quadro 2

Capacidade de previsão do método BCOP na identificação de produtos químicos que não necessitam de ser classificados em termos de irritação ocular nem de lesões oculares graves («não-irritantes») [nenhuma categoria ou não (categoria 1 + categoria 2) no sistema GHS da ONU/CRE da UE; categoria IV ou não (categoria I + categoria II + categoria III) no sistema EPA dos E.U.A.].

Sistema de classificação	N.º	Exatidão		Sensibilidade		Falsos negativos		Especificidade		Falsos positivos	
		%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º
Sistema GHS da ONU Sistema CRE da UE	196	68,88	135/196	100	107/107	0	0/107	31,46	28/89	68,54	61/89
Sistema EPA dos E.U.A.	190	82,11	156/190	93,15	136/146	6,85	10/146	45,45	20/44	54,55	24/44

▼M7

Apêndice 3

PRODUTOS QUÍMICOS RECOMENDADOS PARA DEMONSTRAÇÃO DE COMPETÊNCIA TÉCNICA NO MÉTODO DE ENSAIO DE OPACIDADE E PERMEABILIDADE DA CÓRNEA EM BOVINOS (BCOP)

Antes de este método de ensaio passar a ser utilizado por rotina, os laboratórios devem comprovar a sua competência técnica identificando corretamente a classificação de perigosidade ocular dos 13 produtos químicos recomendados no quadro 1. Estes produtos químicos foram selecionados de modo a representarem a gama de reações de perigo ocular obtidas no ensaio ocular *in vivo* no coelho (TG 405) (17), com base no sistema de classificação GHS da ONU (categorias 1, 2A, 2B ou não-classificado) (4). Outros critérios de seleção foram a disponibilidade do produto químico no comércio, a existência de dados de referência *in vivo* de alta qualidade e a existência de dados *in vitro* de alta qualidade pelo método BCOP. O *Streamlined Summary Document* (3) e o *Background Review Document* do ICCVAM relativo ao método de ensaio BCOP (2) (18) contêm dados de referência.

Quadro 1

Produtos químicos recomendados para demonstração de competência técnica no método BCOP.

Produto químico	N.º CAS (CASRN)	Classe química (1)	Fase	Classificação *in vivo* (2)	Classificação pelo método BCOP
Cloreto de benzalcónio (5 %)	8001-54-5	Sal de amónio quaternário	Líquida	Categoria 1	Categoria 1
Clorexidina	55-56-1	Amina, amidina	Sólido	Categoria 1	Categoria 1
Ácido dibenzoil-L-tartárico	2743-38-6	Ácido carboxílico, éster	Sólida	Categoria 1	Categoria 1
Imidazole	288-32-4	Composto heterocíclico	Sólida	Categoria 1	Categoria 1
Ácido tricloroacético (30 %)	76-03-9	Ácido carboxílico	Líquida	Categoria 1	Categoria 1
Cloreto de 2,6-diclorobenzoílo	4659-45-4	Halogeneto de acilo	Líquida	Categoria 2A	Previsão exata/fiável impossível
2-Metilacetoacetato de etilo	609-14-3	Cetona, éster	Líquida	Categoria 2B	Previsão exata/fiável impossível
Nitrato de amónio	6484-52-2	Sal inorgânico	Sólida	Categoria 2 (3)	Previsão exata/fiável impossível
EDTA, sal dipotássico	25102-12-9	Amina, ácido carboxílico (sal)	Sólida	Não-classificado	Não-classificado
Tween 20	9005-64-5	Éster, poliéter	Líquida	Não-classificado	Não-classificado
2-Mercaptopirimidina	1450-85-7	Halogeneto de acilo	Sólida	Não classificado	Não classificado
Fenilbutazona	50-33-9	Composto heterocíclico	Sólida	Não-classificado	Não-classificado

▼**M7**

Produto químico	N.º CAS (CASRN)	Classe química ([1])	Fase	Classificação *in vivo* ([2])	Classificação pelo método BCOP
Éter laurílico de polioxietileno (23) (BRIJ 35) (10 %)	9002-92-0	Álcool	Líquida	Não-classificado	Não-classificado

Abreviaturas: CASRN = Número de registo do *Chemical Abstracts Service*.

([1]) Os produtos químicos foram classificados em classes químicas segundo um sistema normalizado, com base nos *Medical Subject Heading* («classificadores de temas médicos», MeSH) da Biblioteca Nacional de Medicina dos Estados Unidos da América (http//www.nlm.nih.gov/mesh).

([2]) Com base nos resultados do ensaio ocular *in vivo* no coelho (TG 405 da OCDE) (17) e no sistema GHS da ONU (4).

([3]) A classificação na categoria 2A ou 2B depende da interpretação do critério do sistema GHS da ONU para distinguir estas categorias: se para a classificação 2A poder ser atribuída é necessário que 1 em 3 ou que 2 em 3 animais exibam efeitos ao sétimo dia. O estudo *in vivo* incidiu em 3 animais. Todos os animais recuperaram para a pontuação 0 ao sétimo dia, ou antes, em todos os parâmetros, exceto a vermelhidão da conjuntiva num animal. Ao sétimo dia, este animal apresentava vermelhidão da conjuntiva com pontuação 1; ao décimo dia, estava totalmente recuperado.

▼M7

Apêndice 4

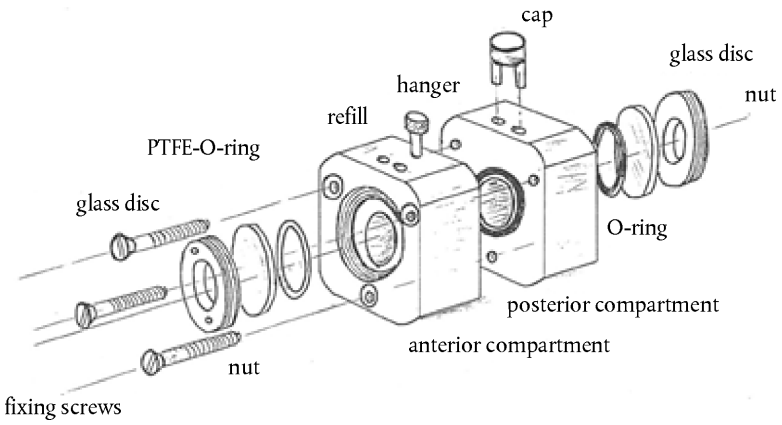
SUPORTE DE CÓRNEA PARA O ENSAIO BCOP

Os suportes de córnea utilizados no método BCOP são feitos de um material inerte (por exemplo, polipropileno) e constituídos por duas metades (uma anterior e outra posterior), possuindo duas câmaras cilíndricas internas semelhantes. Está previsto cada câmara conter um volume de cerca de 5 ml. A câmara termina numa janela de vidro, através da qual são efetuadas as medições de opacidade. As dimensões interiores de cada câmara são 1,7 cm de diâmetro e 2,2 cm de profundidade ([1]). Para evitar fugas, aplica-se uma anilha na câmara posterior. Coloca-se a córnea sobre a anilha da câmara posterior, com a parte endotelial voltada para esse lado, e aplica-se a câmara anterior sobre a parte epitelial da córnea. As câmaras são fixadas com três parafusos periféricos de aço inoxidável. Na extremidade de cada câmara existe uma janela de vidro, que pode ser retirada para facilitar o acesso à córnea. Novamente para evitar fugas, coloca-se uma anilha entre cada câmara e a janela de vidro. Para se poder introduzir e remover o meio de ensaio e os produtos químicos em estudo, há na parte superior de cada câmara dois orifícios, que são fechados com tampas de borracha durante os períodos de tratamento e de incubação. A transmissão de luz através dos suportes de córnea pode alterar-se porque o desgaste ou a acumulação de resíduos de determinados produtos químicos nos orifícios da câmara interna ou na janela de vidro podem afetar a refletância ou a dispersão da luz. Em consequência, a transmissão de luz através dos suportes de córnea correspondente à linha de base pode aumentar ou diminuir (e as leituras de opacidade correspondentes podem diminuir ou aumentar), podendo observar-se diferenças significativas em determinadas câmaras, nas medições iniciais de opacidade da córnea, relativamente ao esperado para a linha de base (isto é, os valores iniciais de opacidade da córnea em determinados suportes de córnea podem facilmente apresentar uma diferença de duas ou três unidades de opacidade em relação aos valores de linha de base esperados). O laboratório deve ponderar pôr em prática um programa de avaliação das variações de transmissão de luz através dos suportes de córnea, em função da natureza dos produtos químicos ensaiados e da frequência de utilização das câmaras. Para determinar os valores correspondentes à linha de base, os suportes de córnea podem ser verificados antes de começarem a ser utilizados, medindo os valores de opacidade (ou de transmissão de luz) correspondentes à linha de base das câmaras cheias com o meio completo, mas sem as córneas. Em seguida, verifica-se periodicamente, durante a utilização, se a transmissão de luz através dos suportes de córnea sofreu alguma variação. O laboratório pode estabelecer a frequência desta verificação dos suportes de córnea, com base nos produtos químicos ensaiados, na frequência de utilização e nas variações observadas nos valores de linha de base de opacidade da córnea. Caso se observem variações significativas da transmissão de luz através dos suportes de córnea, será necessário ponderar a aplicação de procedimentos adequados de limpeza e/ou polimento da superfície interna dos ditos suportes ou mesmo a sua substituição.

([1]) Estas dimensões referem-se a suportes de córnea utilizados para vacas com idade compreendida entre 12 e 60 meses. Se a idade dos animais se situar entre 6 e 12 meses, o suporte deve estar preparado para que cada câmara possa receber um volume de 4 ml, sendo as dimensões internas da câmara de 1,5 cm de diâmetro e 2,2 cm de profundidade. É muito importante que, em qualquer novo suporte de córnea que venha a ser concebido, a razão entre a superfície de córnea exposta e o volume da câmara posterior seja idêntica à que se verifica nos suportes de córnea convencionais. Isto é necessário para garantir que os valores de permeabilidade são determinados corretamente para o cálculo do IVIS pela fórmula proposta.

▼M7

Suporte de córnea: Diagrama expandido.



▼M7

Apêndice 5

OPACÍMETRO

Trata-se de um dispositivo que mede a transmissão de luz. No caso do equipamento OP-KIT da Electro Design (Riom, França) utilizado na validação do método de ensaio BCOP, envia-se luz de uma lâmpada de halogéneo, através de um compartimento de controlo (câmara vazia, sem janelas nem líquido), para uma célula fotoelétrica e compara-se com a luz igualmente enviada para uma célula fotoelétrica através do compartimento experimental, que compreende a câmara na qual se colocou a córnea. O dispositivo compara a luz transmitida para as células fotoelétricas, determina a diferença e exibe o valor numérico da opacidade num visor digital. Estabelecem-se as unidades de opacidade. Podem ser utilizados outros tipos de opacímetro, com uma configuração diferente (por exemplo: que não exijam a medição em paralelo do compartimento de controlo e do compartimento experimental), se comprovadamente derem resultados similares aos do equipamento validado.

O opacímetro deve responder linearmente num intervalo de valores de opacidade que cubra os limites utilizados para todas as classificações descritas no modelo de previsão (ou seja, até ao limite de corrosão/irritação severa). Para obter uma escala de leitura linear e exata até 75-80 unidades de opacidade, é necessário calibrar o opacímetro com uma série de calibradores. Para isso, colocam-se calibradores na câmara de calibração (câmara de suporte de córnea concebida para a inserção de calibradores) e efetuam-se as leituras correspondentes com o opacímetro. A câmara de calibração é desenhada de modo que os calibradores nela sejam inseridos a uma distância entre a fonte de luz e a célula fotoelétrica aproximadamente igual à utilizada nas medições de opacidade com córneas. Os valores de referência e o ponto de regulação inicial dependem do tipo de equipamento. É necessário aplicar a cada instrumento os procedimentos adequados para garantir a linearidade das medições de opacidade. Por exemplo, no caso do equipamento OP-KIT da Electro Design (Riom, França), começa-se por calibrar o zero do opacímetro utilizando a câmara de calibração sem nenhum calibrador. Em seguida, colocam-se sucessivamente nessa câmara três calibradores diferentes, medindo-se as opacidades respetivas. As leituras de opacidade correspondentes aos calibradores 1, 2 e 3 devem ser iguais aos respetivos valores estabelecidos – 75, 150 e 225 unidades de opacidade –, com um desvio de ± 5 %.

▼M7

B.48. MÉTODO DE ENSAIO EM OLHOS DE FRANGO ISOLADOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE PRODUTOS QUÍMICOS INDUTORES DE LESÕES OCULARES GRAVES E DE PRODUTOS QUÍMICOS QUE NÃO NECESSITEM DE SER CLASSIFICADOS EM TERMOS DE IRRITAÇÃO OCULAR NEM DE LESÕES OCULARES GRAVES

INTRODUÇÃO

Este método de ensaio é equivalente ao *Test Guideline* 438 (2013) da OCDE. O método de ensaio em olhos de frango isolados (*Isolated Chicken Eye* (ICE)) foi avaliado em 2006 e 2010 pelo ICCVAM (*Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*), em colaboração com o ECVAM (*European Centre for the Validation of Alternative Methods*) e o JaCVAM (*Japanese Center for the Validation of Alternative Methods*) (1) (2) (3). A primeira avaliação permitiu validar cientificamente a utilidade do método de ensaio ICE na despistagem de produtos químicos (substâncias e misturas) indutores de lesões oculares graves (categoria 1), conforme definição do Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS) da ONU (1) (2) (4) e do Regulamento (CE) n.º 1272/2008, relativo à classificação, rotulagem e embalagem de substâncias e misturas (CRE) ([1]). A segunda avaliação incidiu na utilidade do método para a despistagem de produtos químicos não classificados em termos de irritação ocular nem de lesões oculares graves, conforme definição do sistema GHS da ONU (3) (4). Os resultados do estudo de validação e as recomendações do painel de pares avaliadores confirmaram a recomendação inicial no sentido da utilização do método ICE na classificação de produtos químicos indutores de lesões oculares graves (categoria 1 do sistema GHS da ONU), pois a base de dados disponível manteve-se inalterada desde a primeira validação pelo ICCVAM. Nessa fase, não se recomendou o alargamento do domínio de aplicabilidade do método ICE a outras categorias. Para ajuizar da utilidade do método ICE na identificação de produtos químicos a dispensar de uma classificação em termos de irritação ocular ou de lesões oculares graves, reavaliou-se a série de dados *in vitro* e *in vivo* utilizada no estudo de validação (5). Concluiu-se dessa reavaliação que o método ICE também pode ser utilizado na identificação de produtos químicos que não necessitem de ser classificados em termos de irritação ocular nem de lesões oculares graves, conforme definição do sistema GHS da ONU (4) (5). O presente método inclui as utilizações recomendadas e as limitações do método de ensaio ICE decorrentes das referidas avaliações. Principais diferenças entre a versão inicial de 2009 e a versão atualizada de 2013 do *Test Guideline* da OCDE (enumeração não-exaustiva): utilização do método ICE na identificação de produtos químicos que não necessitam de ser classificados no sistema de classificação GHS da ONU; atualização dos elementos a constar dos relatórios dos ensaios; atualização do apêndice 1, relativo às definições; atualização do apêndice 2, relativo à lista de produtos químicos recomendados para demonstração de competência técnica.

É geralmente aceite que, no futuro previsível, não estará disponível nenhum ensaio de irritação ocular *in vitro* único, alternativo ao ensaio ocular *in vivo* pelo método de Draize, para previsões em toda a gama de irritação que cubram as diferentes classes de produtos químicos. Porém, a combinação de vários métodos de ensaio alternativos no âmbito de uma estratégia de ensaio sequencial (por etapas) pode substituir-se ao ensaio ocular pelo método de Draize (6). A abordagem descendente (7) destina-se a ser utilizada quando, com base nas informações disponíveis, for previsível que o produto químico tenha elevado potencial irritante, ao passo que a abordagem ascendente (7) se destina a ser utilizada quando, com base nas informações disponíveis, for previsível que o produto químico não provoque irritação ocular suficiente para que seja necessário classificá-lo. O método de ensaio ICE é um método *in vitro* que pode ser utilizado em determinadas circunstâncias, respeitadas determinadas limitações, como descrito nos pontos 8 a 10, para classificar e rotular produtos químicos

([1]) Regulamento (CE) n.º 1272/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16 de dezembro de 2008, relativo à classificação, rotulagem e embalagem de substâncias e misturas, que altera e revoga as Diretivas 67/548/CEE e 1999/45/CE, e altera o Regulamento (CE) n.º 1907/2006 (JO L 353 de 31.12.2008, p. 1).

▼M7

em função da perigosidade ocular dos mesmos. Embora não se considere, por si só, uma alternativa válida ao ensaio ocular *in vivo* no coelho, o método de ensaio ICE é recomendado como etapa inicial numa estratégia de ensaio do tipo da abordagem descendente proposta por Scott *et al.* (7) para identificar, sem necessidade de ensaios complementares, produtos químicos indutores de lesões oculares graves, isto é, produtos químicos classificáveis na categoria 1 do sistema GHS da ONU (4). O método ICE é igualmente recomendado para identificar produtos químicos que não necessitem de ser classificados em termos de irritação ocular nem de lesões oculares graves, conforme definição do sistema GHS da ONU («nenhuma categoria» NC) (4), pelo que pode constituir a etapa inicial numa estratégia de ensaio como a abordagem ascendente (7). Todavia, se a aplicação do método ICE a um determinado produto químico não permitir prever se este causa lesões oculares graves ou que não é necessário classificá-lo em termos de irritação ocular nem de lesões oculares graves, o produto químico em causa terá de ser sujeito a ensaios adicionais (*in vitro* e/ou *in vivo*) para determinar a classificação definitiva. Por outro lado, as autoridades reguladoras competentes devem ser consultadas antes de se utilizar o método ICE numa abordagem ascendente no âmbito de sistemas de classificação diversos do sistema GHS da ONU.

Na descrição deste método de ensaio, pretende-se explicar o processo utilizado para avaliar o potencial de perigosidade ocular de um produto químico, medido pela capacidade deste de induzir toxicidade em olhos de frango desorbitados. Medem-se os efeitos tóxicos na córnea do seguinte modo: i) avaliação qualitativa da opacidade; ii) avaliação qualitativa das lesões epiteliais após aplicação de fluoresceína ao olho (retenção da fluoresceína); iii) determinação quantitativa do espessamento (edema); iv) avaliação qualitativa das lesões morfológicas macroscópicas na superfície. Após exposição ao produto químico em estudo, avaliam-se separadamente a opacidade, o edema e as lesões da córnea; em seguida, combinam-se os resultados a fim de obter a classificação de irritação ocular.

Estabelecem-se definições no apêndice 1.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES

Este método de ensaio baseia-se no protocolo proposto no documento de orientações n.º 160 da OCDE (8), que foi elaborado no seguimento de um estudo de validação internacional do ICCVAM (1) (3) (9) e contou com contributos do ECVAM (*European Centre for the Validation of Alternative Methods*), do JaCVAM (*Japanese Center for the Validation of Alternative Methods*) e do *Quality of Life Department of Toxicology and Applied Pharmacology* do TNO (Países Baixos). O protocolo baseia-se na informação obtida nos protocolos publicados e no protocolo que está a ser utilizado pelo TNO (10) (11) (12) (13) (14).

Durante a validação deste método de ensaio, ensaiou-se uma vasta gama de produtos químicos, contando a base de dados empírica do estudo de validação com 152, distribuídos por 72 substâncias e 80 misturas (5). O método é aplicável a sólidos, líquidos, emulsões e géis. Os líquidos podem ser aquosos ou não e os sólidos podem ser solúveis ou insolúveis em água. O estudo de validação ainda não incidiu em gases e aerossóis.

O método ICE pode ser utilizado para identificar produtos químicos indutores de lesões oculares graves, ou seja, produtos químicos classificáveis na categoria 1 do sistema GHS da ONU (4). As limitações identificadas do método ICE, quando utilizado com essa finalidade, decorrem da elevada taxa de falsos positivos, no caso dos álcoois, e das elevadas taxas de falsos negativos, no caso dos sólidos e dos agentes tensioativos (1) (3) (9). As taxas de falsos negativos obtidas neste contexto (identificação de produtos químicos da categoria 1 do sistema GHS da ONU como não pertencentes a essa categoria) não constituem aspeto crítico, porque os produtos químicos que o ensaio considere negativos são seguidamente ensaiados por outros métodos *in vitro* adequadamente validados ou, em derradeira opção, no coelho, conforme as exigências normativas, por recurso a uma estratégia de ensaio sequencial baseada na ponderação da suficiência da prova.

▼M7

Importa salientar que os sólidos podem gerar condições de exposição variáveis e extremas no ensaio de irritação ocular *in vivo* pelo método de Draize, o que é suscetível de falsear as previsões do real potencial de irritação (15). Os investigadores podem ponderar o recurso a este método de ensaio para todos os tipos de produtos químicos, aceitando um resultado positivo como indicativo de lesões oculares graves, ou seja, merecedoras da classificação 1 do sistema GHS da ONU sem necessidade de ensaios complementares. Porém, os resultados positivos obtidos no caso de álcoois devem ser interpretados com cautela, devido ao risco de não serem efetivamente positivos em todos os casos que o indiciem.

Quando utilizado para identificar produtos químicos indutores de lesões oculares graves (categoria 1 do sistema GHS da ONU), a exatidão global do método ICE é de 86 % (120/140), a taxa de falsos positivos é de 6 % (7/113) e a taxa de falsos negativos é de 48 % (13/27), comparativamente aos dados obtidos pelo método de ensaio ocular *in vivo* no coelho, classificados de acordo com o sistema de classificação GHS da ONU (4) (5).

Também pode recorrer-se ao método ICE para identificar produtos químicos que não necessitem de ser classificados em termos de irritação ocular nem de lesões oculares graves no sistema de classificação GHS da ONU (4). As autoridades reguladoras competentes devem ser consultadas antes de se utilizar o método ICE numa abordagem ascendente no âmbito de outros sistemas de classificação. Pode recorrer-se a este método de ensaio para todos os tipos de produtos químicos, aceitando que um resultado negativo constitua razão para não classificar o produto químico em termos de irritação ocular nem de lesões oculares graves. Todavia, um dos resultados da base de dados de validação indicia que as tintas antivegetativas com solventes orgânicos podem ser subavaliadas (5).

Quando utilizado para identificar produtos químicos que não necessitem de ser classificados em termos de irritação ocular nem de lesões oculares graves, a exatidão global do método ICE é de 82 % (125/152), a taxa de falsos positivos é de 33 % (26/79) e a taxa de falsos negativos é de 1 % (1/73), comparativamente aos dados obtidos pelo método de ensaio ocular *in vivo* no coelho, classificados de acordo com o sistema de classificação GHS da ONU (4) (5). Excluindo da base de dados determinados produtos químicos de certas classes (tintas antivegetativas com solventes orgânicos), a exatidão do método ICE é de 83 % (123/149), a taxa de falsos positivos é de 33 % (26/78) e a taxa de falsos negativos é de 0 % (0/71), no sistema de classificação GHS da ONU (4) (5).

Devido ao número considerável de produtos químicos da categoria 1 do sistema GHS da ONU subclassificados na categoria 2, 2A ou 2B do mesmo sistema e de produtos químicos de «nenhuma categoria» do sistema GHS sobreclassificados na categoria 2, 2A ou 2B desse sistema, não se recomenda o recurso ao método ICE na identificação de produtos químicos que devam ser classificados de irritantes oculares (categoria 2 ou 2A do sistema GHS da ONU) nem de produtos químicos que devam ser classificados de irritantes oculares moderados (categoria 2B do sistema GHS da ONU). Nesses casos, podem ser necessários ensaios complementares por outro método, que seja adequado.

Na manipulação de olhos de frango devem seguir-se as regras e procedimentos estabelecidos no laboratório para a manipulação de matérias de origem humana ou animal (tecidos, fluidos biológicos etc.). Recomenda-se a aplicação das precauções gerais inerentes à prática laboratorial (16).

Embora não tenha em conta as lesões na conjuntiva nem na íris, avaliadas pelo método da irritação ocular no coelho, o método ICE tem em conta os efeitos na córnea, fator principal do sistema de classificação GHS da ONU em função dos efeitos *in vivo*. Por outro lado, embora a reversibilidade das lesões da córnea não possa ser avaliada *per se* no método ICE, propôs-se, com base em estudos oculares no coelho, a possibilidade de se recorrer à avaliação da profundidade inicial da lesão da córnea para identificar alguns tipos de efeitos irreversíveis

▼M7

(17). São necessários mais estudos científicos para, nomeadamente, se compreender a ocorrência de efeitos irreversíveis não associados a lesões iniciais importantes. Por último, o método ICE não permite avaliar o potencial de toxicidade sistémica associado à exposição ocular.

Este método de ensaio será atualizado periodicamente em função de novos dados e informações. Por exemplo, a histopatologia é potencialmente útil quando se necessita de uma caracterização mais completa das lesões da córnea. Para ajuizar dessa possibilidade, incentivam-se os utilizadores a preservarem os olhos e a prepararem espécimes histopatológicos que possam ser utilizados na constituição de uma base de dados e na definição de critérios de decisão utilizáveis para melhorar a exatidão deste método de ensaio. A OCDE elaborou um documento de orientações relativas à utilização de métodos de ensaio de toxicidade ocular *in vitro*, o qual descreve pormenorizadamente as colheitas histopatológicas e diz onde apresentar os espécimes e dados histopatológicos (8).

Os laboratórios que comecem a utilizar este método de ensaio devem recorrer aos produtos químicos para demonstração de competência técnica recomendados no apêndice 2. Antes de apresentarem dados obtidos pelo método ICE para efeitos da classificação normativa de perigosidade, os laboratórios podem recorrer aos referidos produtos químicos para demonstrar a sua competência técnica na execução deste método.

PRINCÍPIO DO ENSAIO

O método ICE assenta num modelo organotípico de manutenção de olhos de frango *in vitro* por um período curto. Neste método de ensaio, as lesões provocadas pelo produto químico em estudo são avaliadas por determinação do edema e da opacidade da córnea, bem como da retenção de fluoresceína na córnea. A avaliação dos dois últimos parâmetros é qualitativa, enquanto a análise do edema da córnea é quantitativa. Converte-se cada medida numa pontuação quantitativa, utilizada para calcular um índice global de irritação, ou atribui-se a cada medida uma categoria qualitativa, utilizada para estabelecer uma classificação de perigosidade ocular *in vitro* (categoria 1 ou «não-classificado» no sistema GHS da ONU). Consoante o resultado obtido, pode em seguida prever-se com base nele se o produto químico em estudo é potencialmente causador de lesões oculares graves *in vivo* ou se não necessita de ser classificado em termos de perigosidade ocular (ver «Critérios de decisão»). Porém, não é possível atribuir nenhuma classificação aos produtos químicos que o método ICE não permita prever se são potencialmente causadores de lesões oculares graves ou se não necessitam de ser classificados (ver o ponto 11).

Origem e idade dos olhos de frango

Os olhos utilizados neste ensaio são normalmente colhidos em matadouros, de frangos abatidos para consumo humano, eliminando assim a necessidade de animais de laboratório. Só podem ser utilizados olhos de animais saudáveis considerados adequados para entrarem na cadeia alimentar humana.

Embora não se tenha efetuado nenhum estudo controlado destinado a avaliar a idade ótima dos frangos, as aves utilizadas neste método de ensaio têm habitualmente a idade e o peso dos frangos normalmente abatidos nos matadouros de aves de capoeira (aproximadamente 7 semanas e 1,5 a 2,5 kg).

Colheita e transporte dos olhos para o laboratório

Imediatamente após o atordoamento dos frangos, em geral por descarga elétrica, e incisão no pescoço para sangramento, corta-se-lhes a cabeça. A origem dos frangos deve ser próxima do laboratório, para que as cabeças possam ser transferidas do matadouro para lá com suficiente rapidez, a fim de minimizar a deterioração e/ou contaminações bacteriológicas. Para cumprir os critérios de aceitação do ensaio, o intervalo entre a colheita das cabeças de frango e a colocação dos olhos na câmara de superfusão depois de desorbitados deve ser mínimo (normalmente duas horas). Os olhos utilizados num ensaio devem ser todos do mesmo grupo de colheita num determinado dia.

▼M7

Os olhos são dissecados no laboratório, pelo que se transportam as cabeças intactas do matadouro em caixas de plástico, à temperatura ambiente (normalmente entre 18 °C e 25 °C), humedecidas com papel absorvente embebido em solução salina isotónica.

Critérios de seleção e número dos olhos utilizados no método ICE

Rejeitam-se os olhos que, depois de desorbitados, apresentem uma linha de base elevada de reação cromática à fluoresceína (> 0,5) ou de pontuação de opacidade da córnea (> 0,5).

Cada grupo de tratamento e a amostra de controlo positiva ensaiada em paralelo é constituído por um mínimo de três olhos. O grupo de controlo negativo ou a amostra de controlo do solvente (caso se utilize um solvente que não seja a solução salina) é constituído por, pelo menos, um olho.

No caso das matérias sólidas cujo resultado seja «nenhuma categoria» no sistema GHS da ONU, recomenda-se um segundo ensaio de três olhos, para confirmar ou infirmar o resultado negativo obtido.

PROTOCOLO DE ENSAIO

Preparação dos olhos

Excisam-se cautelosamente as pálpebras, tomando as precauções necessárias para não danificar a córnea. Para avaliar a integridade desta, deita-se na sua superfície uma gota de solução a 2 % (m/v) de fluoresceína de sódio, espera-se alguns segundos e lava-se com solução salina isotónica. Para garantir que a córnea está isenta de lesões (retenção de fluoresceína e pontuação de opacidade da córnea ≤ 0,5), os olhos tratados com fluoresceína são em seguida examinados por meio de um microscópio equipado com lâmpada de fenda.

Se o olho não apresentar lesões, disseca-se completamente do crânio, tomando as precauções necessárias para não danificar a córnea. Para retirar o globo ocular da órbita, prende-se firmemente a membrana nictante com uma pinça cirúrgica e cortam-se os músculos oculares com uma tesoura encurvada de pontas rombas. É importante evitar lesões da córnea provocadas por pressão excessiva (ditas artefactos de compressão).

Ao remover o olho da órbita, deve deixar-se agarrada àquele uma porção visível do nervo ótico. Uma vez desorbitado, coloca-se o olho numa compressa absorvente e cortam-se a membrana nictante e os restantes tecidos de ligação.

Coloca-se o olho desorbitado num suporte de aço inoxidável, com a córnea na vertical, e transfere-se o conjunto para uma das câmaras do aparelho de superfusão (18). Colocam-se os suportes no aparelho de superfusão de modo tal que a solução salina isotónica goteje sobre toda a córnea (3 a 4 gotas por minuto ou 0,1 a 0,15 ml/minuto). As câmaras do aparelho de superfusão devem ser termostatizadas a 32 ± 1,5 °C. Apresenta-se no apêndice 3 um diagrama de um aparelho de superfusão típico e dos suportes oculares, que podem ser adquiridos no comércio ou construídos. O aparelho pode ser modificado para corresponder às necessidades do laboratório (por exemplo para nele ser introduzida outra quantidade de olhos).

Depois de colocados no aparelho de superfusão, examinam-se novamente os olhos ao microscópio com lâmpada de fenda, para garantir que não foram danificados durante a dissecação. Mede-se também nessa ocasião a espessura da córnea no seu ápice, utilizando o dispositivo de medição de profundidade incorporado no microscópio. Devem ser substituídos os olhos que apresentem: i) pontuação de retenção de fluoresceína > 0,5; ii) opacidade da córnea > 0,5; iii) qualquer outro sinal de dano. Rejeitam-se ainda os olhos que, não tendo sido rejeitados com base em nenhum destes critérios, apresentem uma espessura de córnea com desvio superior a 10 % em relação ao valor médio correspondente a todos os olhos. Alertam-se os utilizadores para o facto de os microscópios com lâmpada de fenda poderem dar resultados diferentes para as medições de espessura da córnea se a regulação da fenda for outra. A largura da fenda deve ser regulada a 0,095 mm.

▼M7

Os olhos examinados e aprovados são incubados durante 45 a 60 minutos, para estabelecer o equilíbrio com o sistema de ensaio antes da aplicação do produto químico em estudo. Terminado o período previsto para se atingir o equilíbrio, regista-se como linha de base (tempo = 0) uma determinação de referência «zero» de opacidade e de espessura da córnea. A pontuação de retenção de fluoresceína determinada na dissecação é utilizada para linha de base deste parâmetro.

Aplicação do produto químico em estudo

Imediatamente após as determinações de referência «zero» remove-se o olho (mantendo-o no suporte) do aparelho de superfusão e coloca-se na horizontal, aplicando-se na córnea o produto químico em estudo.

Os produtos químicos líquidos são normalmente ensaiados sem diluição, mas, se for considerado necessário (devido ao modo como o estudo foi concebido, por exemplo), podem ser diluídos. O solvente preferido para diluir os produtos químicos é soro fisiológico. Embora possam utilizar-se outros solventes, em condições controladas, será necessário demonstrar que são adequados.

Os produtos químicos em estudo líquidos aplicam-se na córnea de modo a cobri-la uniformemente. O volume normal é 0,03 ml.

Se isso for realizável, os produtos químicos sólidos devem ser moídos o máximo possível com um pilão num almofariz, ou com um dispositivo de moagem comparável. O pó é depois aplicado na córnea de modo a cobrir uniformemente a superfície desta com o produto químico em estudo. A quantidade normal é 0,03 g.

Mantém-se o produto químico (líquido ou sólido) aplicado na córnea durante 10 segundos e, em seguida, lava-se o olho com solução salina isotónica à temperatura ambiente (cerca de 20 ml), para remover o produto. Recoloca-se em seguida o olho (no seu suporte) no aparelho de superfusão, na posição vertical original. Em caso de necessidade, podem ser feitas lavagens adicionais após a aplicação durante 10 segundos e ulteriormente (por exemplo caso se detetem na córnea resíduos do produto químico em estudo). Em geral, a quantidade de solução salina adicionalmente utilizada em lavagens não é demasiado importante, mas é-o a observação da aderência do produto químico à córnea.

Produtos químicos de controlo

Em cada ensaio são ensaiadas em paralelo amostras de controlo positivas e negativas (ou do solvente/excipiente).

Ao ensaiar pelo método ICE líquidos a 100 % ou sólidos, utiliza-se soro fisiológico como amostra de controlo negativa ensaiada em paralelo, para possibilitar a deteção de alterações inespecíficas do sistema de ensaio e evitar que as condições do ensaio provoquem, inadequadamente, uma reação de irritação.

Ao ensaiar líquidos diluídos, o método compreende o ensaio em paralelo de um grupo de amostras de controlo do excipiente/solvente, para possibilitar a deteção de alterações inespecíficas do sistema de ensaio e evitar que as condições do ensaio provoquem, inadequadamente, uma reação de irritação. Como se referiu no ponto 31, só podem utilizar-se solventes/excipientes que, comprovadamente, não tenham efeitos adversos no sistema de ensaio.

Para verificar se é induzida uma reação adequada, inclui-se em cada ensaio um irritante ocular conhecido, que servirá de amostra de controlo positiva ensaiada em paralelo. Como o ensaio ICE é utilizado neste método para identificar efeitos corrosivos ou irritantes severos, a amostra de controlo positiva deve ser um produto químico de referência que induza uma reação severa ao aplicar-se-lhe o método. Porém, para que possa determinar-se a variabilidade, ao longo do tempo, da reação à referida amostra de controlo positiva, essa reação não deve ser excessivamente forte. Os dados *in vitro* de que se disponha para amostras de

▼M7

controlo positivas devem ser suficientes para calcular um intervalo aceitável, estatisticamente definido, para essas amostras de controlo. Caso não se disponha de dados históricos adequados do método ICE para uma determinada amostra de controlo positiva, pode ser necessário efetuar estudos para obter tais informações.

Como amostras de controlo positivas para produtos químicos líquidos em estudo, podem ser utilizados, por exemplo, ácido acético a 10 % ou cloreto de benzalcónio a 5 %. Como amostras de controlo positivas para produtos químicos sólidos em estudo, podem ser utilizados, por exemplo, hidróxido de sódio ou imidazole.

Os produtos químicos de referência são úteis para avaliar o potencial de irritação ocular de produtos químicos desconhecidos de uma determinada classe química ou classe de produtos, ou para avaliar o potencial de irritação relativo de um irritante ocular numa determinada gama de reações de irritação.

Parâmetros medidos

Avaliam-se as córneas tratadas antes do tratamento e decorridos 30, 75, 120, 180 e 240 minutos (± 5 minutos) após a lavagem subsequente ao tratamento. Obtém-se, assim, um número adequado de determinações no período de quatro horas que se segue ao tratamento, garantindo ainda um intervalo entre determinações suficiente para a realização das observações necessárias em todos os olhos.

Os parâmetros avaliados são a opacidade e o edema da córnea, a retenção de fluoresceína na córnea e efeitos morfológicos na córnea (picado epitelial ou perda de epitélio, por exemplo). Com exceção da retenção de fluoresceína (que só é determinada antes do tratamento e 30 minutos após a exposição ao produto químico em estudo), todos estes parâmetros são determinados nos tempos acima referidos.

Recomenda-se o recurso a fotografias para documentar a opacidade da córnea, a retenção de fluoresceína na córnea, os efeitos morfológicos e, se for efetuada, a histopatologia.

Recomenda-se aos utilizadores que, depois do último exame, iniciado 4 horas após o tratamento, conservem os olhos num fixador adequado (por exemplo formol tamponado neutro), para eventual exame histopatológico (mais elementos no ponto 14 e na referência 8).

Determina-se o edema da córnea medindo a espessura da córnea com o paquímetro ótico do microscópio com lâmpada de fenda. O resultado é expresso em percentagem e é calculado a partir das determinações de espessura da córnea, por meio da seguinte fórmula:

$$\left(\frac{\textit{espessura da córnea em } t - \textit{espessura da córnea em} = 0}{\textit{espessura da córnea em} = 0} \right) \times 100$$

Calcula-se a média percentual dos edemas da córnea de todos os olhos ensaiados em cada instante «t» considerado. Com base na pontuação média mais elevada de edema da córnea, observada em qualquer dos instantes considerados, atribui-se, em seguida, a pontuação global desta categoria ao produto químico em estudo (ver o ponto 51).

Avalia-se a opacidade da córnea atribuindo uma pontuação, como indica o quadro 1, à superfície que se encontre mais densamente opacificada em cada córnea. Calcula-se o valor médio de opacidade da córnea de todos os olhos ensaiados em cada instante considerado. Com base na pontuação média mais elevada de opacidade da córnea, observada em qualquer dos instantes considerados, atribui-se, em seguida, a pontuação global desta categoria ao produto químico em estudo (ver o ponto 51).

▼M7

Quadro 1

Pontuações de opacidade da córnea.

Pontuação	Observações
0	Ausência de opacidade
0,5	Opacidade muito ligeira
1	Zonas dispersas ou difusas; detalhes da íris claramente visíveis
2	Zona translúcida claramente discernível; detalhes da íris ligeiramente obscurecidos
3	Forte opacidade da córnea; nenhum detalhe da íris visível; tamanho da pupila dificilmente discernível
4	Opacidade completa da córnea; íris invisível

A retenção de fluoresceína só é avaliada (como indica o quadro 2) quando da observação que tem lugar decorridos 30 minutos. Calcula-se em seguida o valor médio da retenção de fluoresceína de todos os olhos ensaiados correspondente à observação efetuada aos 30 minutos, utilizando-se esse valor para atribuir uma pontuação global desta categoria ao produto químico em estudo (ver o ponto 51).

Quadro 2

Pontuações de retenção de fluoresceína.

Pontuação	Observações
0	Ausência de retenção de fluoresceína
0,5	Número muito reduzido de células isoladas coradas
1	Células isoladas coradas dispersas pela zona tratada da córnea
2	Focos ou confluência densa de células isoladas coradas
3	Retenção de fluoresceína em zonas extensas confluentes da córnea

Incluem-se nos efeitos morfológicos o «picado» das células epiteliais da córnea, a «perda» de epitélio, a «aspereza» da superfície da córnea e a «colagem» do produto químico em estudo à córnea. Estes efeitos podem ser concomitantes e de intensidade variável. A sua classificação é subjetiva e depende da interpretação do investigador.

DADOS E RELATÓRIOS

Avaliação dos dados

Avaliam-se separadamente os resultados de opacidade da córnea, edema da córnea e retenção de fluoresceína na córnea para determinar a classe correspondente a cada um destes parâmetros pelo método ICE. Combinam-se depois essas classes de modo a obter a classificação de irritação correspondente ao produto químico em estudo.

Critérios de decisão

Uma vez efetuada a avaliação de cada parâmetro, podem atribuir-se as classes ICE com base em intervalos preestabelecidos. Estabelece-se a correspondência entre os valores de edema da córnea (quadro 3), opacidade da córnea (quadro 4) e retenção de fluoresceína na córnea (quadro 5) e quatro classes ICE, de acordo com as escalas a seguir indicadas. Importa referir que as pontuações de edema da córnea indicadas no quadro 3 só são aplicáveis se a espessura for medida por meio de um microscópio com lâmpada de fenda (por exemplo Haag-Streit

▼M7

BP900) dotado do dispositivo n.º 1 de medição de profundidade e com a largura da fenda regulada a $9\frac{1}{2}$, correspondente a 0,095 mm. Alertam-se os utilizadores para o facto de os microscópios com lâmpada de fenda poderem dar resultados diferentes nas medições de espessura da córnea se a regulação da fenda for outra.

Quadro 3

Critérios de classificação ICE de edema da córnea.

Valor médio de edema da córnea (%) (*)	Classe ICE
0 a 5	I
> 5-12	II
> 12-18 (> 75 minutos após o tratamento)	II
> 12-18 (≤ 75 minutos após o tratamento)	III
> 18-26	III
> 26-32 (> 75 minutos após o tratamento)	III
> 26-32 (≤ 75 minutos após o tratamento)	IV
> 32	IV

(*) Pontuação média mais elevada observada em qualquer dos instantes considerados.

Quadro 4

Critérios de classificação ICE de opacidade.

Valor máximo de pontuação média de opacidade (*)	Classe ICE
0,0-0,5	I
0,6-1,5	II
1,6-2,5	III
2,6-4,0	IV

(*) Valor máximo da pontuação média observado em qualquer dos instantes considerados (com base nas pontuações de opacidade definidas no quadro 1).

Quadro 5

Critérios de classificação ICE de retenção média de fluoresceína.

Valor médio da pontuação de retenção de fluoresceína 30 minutos após o tratamento (*)	Classe ICE
0,0-0,5	I
0,6-1,5	II
1,6-2,5	III
2,6-3,0	IV

(*) Com base nas pontuações definidas no quadro 2.

Para determinar a classificação *in vitro* do produto químico em estudo, utiliza-se o quadro 6 para estabelecer a correspondência entre a classificação GHS e a combinação das categorias obtidas para o edema da córnea, a opacidade da córnea e a retenção de fluoresceína na córnea.

▼M7

Quadro 6

Classificações globais *in vitro*

Classificação no sistema GHS da ONU	Combinações dos três parâmetros medidos
Nenhuma categoria	3 × I 2 × I, 1 × II
Previsão impossível	Outras combinações
Categoria 1	3 × IV 2 × IV, 1 × III 2 × IV, 1 × II (*) 2 × IV, 1 × I (*) Opacidade da córnea ≥ 3 aos 30 minutos (em pelo menos 2 olhos) Opacidade da córnea = 4 em qualquer momento (em pelo menos 2 olhos) Perda substancial de epitélio (em pelo menos 1 olho)

(*) Combinações menos prováveis.

Critérios de aceitação do estudo

Considera-se o ensaio aceitável se às amostras de controlo negativas ou do excipiente/solvente ensaiadas em paralelo e às amostras de controlo positivas ensaiadas em paralelo corresponderem as classificações do sistema GHS «não classificado» e «categoria 1» respetivamente.

Relatório do ensaio

O relatório do ensaio deve incluir os elementos seguintes que sejam pertinentes na realização do estudo:

Produtos químicos em estudo e de controlo

— Denominação(ões) química(s), como a denominação estrutural utilizada pelo *Chemical Abstracts Service* (CAS), seguida de outras denominações, se existirem;

— Número de registo CAS, se conhecido;

— Grau de pureza e composição dos produtos químicos em estudo/de controlo (em percentagem ponderal), se conhecidos;

— Propriedades físico-químicas (por exemplo: estado físico, volatilidade, pH, estabilidade, classe química, hidrossolubilidade) relevantes para a realização do estudo;

— Pré-tratamento dos produtos químicos em estudo/de controlo, se for o caso (aquecimento ou moagem, por exemplo);

— Estabilidade, se conhecida.

Informações relativas ao patrocinador e ao laboratório

— Nome e endereço do patrocinador, do laboratório e do diretor do estudo;

— Indicação da origem dos olhos (por exemplo a instalação na qual foram colhidos).

Condições do método de ensaio

— Descrição do sistema de ensaio utilizado;

▼M7

— Microscópio com lâmpada de fenda utilizado (modelo etc.) e regulações desse instrumento;

— Referência a resultados históricos de amostras de controlo negativas e positivas e, se for aplicável, referência a dados históricos comprovativos dos intervalos aceitáveis das amostras de referência de controlo ensaiadas em paralelo;

— Processo utilizado para garantir a integridade (exatidão e fiabilidade) do método de ensaio ao longo do tempo (por exemplo: ensaio periódico dos produtos químicos recomendados para demonstração de competência técnica).

Colheita e preparação dos olhos

— Idade e peso do animal dador e, se conhecidas, outras especificidades dos animais nos quais os olhos foram colhidos (sexo e estirpe, por exemplo).

— Condições de armazenamento e de transporte dos olhos (por exemplo: data-hora da colheita dos olhos, intervalo entre a colheita das cabeças de frango e a colocação dos olhos na câmara de superfusão depois de desorbitados);

— Preparação e montagem dos olhos, incluindo informações sobre a qualidade dos mesmos, a temperatura das câmaras dos olhos e os critérios de seleção dos olhos utilizados no ensaio.

Protocolo de ensaio

— Número de replicados utilizados;

— Identificação das amostras de controlo negativa e positiva utilizadas (e das amostras de controlo de referência e do solvente, se for caso disso);

— Dose e modo de aplicação do produto químico em estudo e tempo de exposição a ele;

— Instantes de observação (antes e depois do tratamento);

— Descrição dos critérios de avaliação e de decisão utilizados;

— Descrição dos critérios de aceitação do estudo utilizados;

— Descrição de eventuais modificações ao protocolo do ensaio.

Resultados

— Quadros das pontuações de edema da córnea, de opacidade da córnea e de retenção de fluoresceína obtidas para cada olho em cada instante de observação, incluindo as pontuações médias de todos os olhos ensaiados em cada instante de observação;

— Valor máximo da pontuação média observada (em qualquer instante de observação) para o edema da córnea, a opacidade da córnea e a retenção de fluoresceína e as classes ICE correspondentes;

— Descrição de outros efeitos eventualmente observados;

— Classificação *in vitro* segundo o sistema GHS da ONU;

— Se for caso disso, fotografias dos olhos.

Discussão dos resultados

Conclusões

▼**M7**

REFERÊNCIAS

1) ICCVAM (2007). Test Method Evaluation Report — *In Vitro Ocular Toxicity* Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Disponível em: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm.

2) ESAC (2007). Statement on the conclusion of the ICCVAM retrospective study on organotypic *in vitro* assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe eye irritants. Disponível em: http://ecvam.jrc.it/index.htm.

3) ICCVAM (2010). ICCVAM Test Method Evaluation Report — Current Status of *in vitro* Test Methods for Identifying Mild/Moderate Ocular Irritants: The Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 10-7553A. Disponível em: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm.

4) Nações Unidas (ONU) (2011). Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos da ONU (GHS), 2.ª edição revista, ONU Nova Iorque e Genebra, 2011. Disponível em: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev04/04files_e.html.

5) Streamlined Summary Document Supporting OECD Test Guideline 438 on the Isolated Chicken Eye for Eye Irritation/Corrosion. Series on Testing and Assessment, No. 188 (parte 1 e parte 2). OCDE, Paris.

6) Capítulo B.5 deste anexo, «Irritação/corrosão ocular agudas»

7) Scott, L., Eskes, C., Hoffman, S., Adriaens, E., Alepee, N., Bufo, M., Clothier, R., Facchini, D., Faller, C., Guest, R., Hamernik, K., Harbell, J., Hartung, T., Kamp, H., Le Varlet, B., Meloni, M., Mcnamee, P., Osborn, R., Pape, W., Pfannenbecker, U., Prinsen, M., Seaman, C., Spielmann, H., Stokes, W., Trouba, K., Vassallo, M., Van den Berghe, C., Van Goethem, F., Vinardell, P., Zuang, V. (2010). A proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *in vivo* Studies Using Bottom-up and Top-down Approaches. *Toxicology In Vitro*, 24, 1-9.

8) OCDE (2011). Guidance Document on The Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) and Isolated Chicken Eye (ICE) Test Methods: Collection of Tissues for Histological Evaluation and Collection of Data on Non-Severe Irritants. Series on Testing and Assessment, No. 160. OCDE, Paris.

9) ICCVAM (2006). Background review document: Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye Test Method. NIH Publication No.: 06-4513. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Disponível em: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm.

10) Prinsen, M.K., Koëter, B.W.M. (1993). Justification of the enucleated eye test with eyes of slaughterhouse animals as an alternative to the Draize eye irritation test with rabbits. *Fd. Chem. Toxicol.*, 31:69-76.

11) DB-ALM (INVITTOX) (2009). Protocol 80: Chicken enucleated eye test (CEET) / Isolated Chicken Eye Test, 13 pp. Disponível em: http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/.

12) Balls, M., Botham, P.A., Bruner, L.H., Spielmann, H. (1995). The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. *Toxicol. In Vitro*, 9:871-929.

13) Prinsen, M.K. (1996). The chicken enucleated eye test (CEET): A practical (pre)screen for the assessment of eye irritation/corrosion potential of test materials. *Food Chem. Toxicol.*, 34:291-296.

▼**M7**

14) Chamberlain, M., Gad, S.C., Gautheron, P., Prinsen, M.K. (1997). IRAG Working Group I: Organotypic models for the assessment/prediction of ocular irritation. *Food Chem. Toxicol.*, 35:23-37.

15) Prinsen, M.K. (2006). The Draize Eye Test and *in vitro* alternatives; a left--handed marriage? *Toxicology In Vitro*, 20,78-81.

16) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Disponível em: http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf.

17) Maurer, J.K., Parker, R.D., Jester, J.V. (2002). Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. *Reg. Tox. Pharmacol.*, 36:106-117.

18) Burton, A.B.G., York, M., Lawrence, R. S. (1981). The *in vitro* assessment of severe irritants. *Fd. Cosmet. Toxicol.* 19, 471-480.

▼M7

Apêndice 1

DEFINIÇÕES

Exatidão: Grau de acordo entre os resultados do método de ensaio e os valores de referência aceites. Constitui uma medida da eficiência do método e um dos aspetos da «adequação». Este termo e o termo «concordância» são muitas vezes utilizados indistintamente para indicar a proporção de resultados corretos do método de ensaio.

Produto químico de referência: Produto químico utilizado como padrão de comparação com o produto químico em estudo. Deve ter as seguintes propriedades: i) origem ou origens uniformes e fiáveis; ii) similaridade estrutural e funcional com a classe de produtos químicos em estudo; iii) características físico-químicas conhecidas; iv) disponibilidade de dados sobre os efeitos conhecidos; v) potência conhecida na gama de reação pretendida.

Abordagem ascendente: Metodologia por etapas utilizada para produtos químicos que se pense não necessitarem de ser classificados em termos de irritação ocular ou de lesões oculares graves; inicia-se com a determinação de produtos químicos que não careçam de classificação (resultado negativo) a partir de outros produtos químicos (resultado positivo).

Produto químico: Substância ou mistura.

Córnea: Parte anterior transparente do globo ocular que recobre a íris e a pupila e deixa passar a luz para o interior.

Opacidade da córnea: Medida do grau de opacidade da córnea depois de exposta ao produto químico em estudo. Um aumento de opacidade da córnea é indicador de lesão da córnea.

Edema da córnea: Medida objetiva, no ensaio ICE, da dilatação da córnea após exposição ao produto químico em estudo. É expressa em percentagem e calculada em relação às medidas da linha de base de espessura da córnea efetuadas antes da aplicação do produto químico em estudo. A espessura é registada a intervalos regulares após exposição ao produto químico em estudo no ensaio ICE. O grau de edema da córnea é um indicador do grau de lesão da córnea.

Irritação ocular: Alterações oculares em consequência da aplicação do produto químico em estudo na superfície anterior do olho, totalmente reversíveis nos 21 dias após a aplicação. Este termo e «efeitos oculares reversíveis» ou «categoria 2 do sistema GHS da ONU» (4) são utilizados indistintamente.

Taxa de falsos negativos: Proporção dos produtos químicos positivos que o método de ensaio considera, erradamente, negativos. É um dos indicadores da eficiência dos métodos de ensaio.

Taxa de falsos positivos: Proporção dos produtos químicos negativos que o método de ensaio considera, erradamente, positivos. É um dos indicadores da eficiência dos métodos de ensaio.

Retenção de fluoresceína: Medida subjetiva, no ensaio ICE, da proporção de fluoresceína de sódio que, após exposição à substância em estudo, é retida pelas células epiteliais da córnea. O grau de retenção da fluoresceína é um indicador do grau de lesão do epitélio da córnea.

Perigo: Propriedade intrínseca de um agente ou de uma situação, suscetível de causar efeitos adversos num organismo, sistema ou (sub)população que seja exposto ao agente em causa.

Efeitos oculares irreversíveis: Ver «Lesões oculares graves» e «Categoria 1 do sistema GHS da ONU».

▼M7

Mistura: Mistura ou solução constituída por duas ou mais substâncias que nela não reagem (4).

Amostra de controlo negativa: Replicado não-tratado que contém todos os componentes do sistema de ensaio. Esta amostra é ensaiada juntamente com as amostras tratadas com o produto químico em estudo e as outras amostras de controlo, para determinar se o solvente interage com o sistema de ensaio.

Não-classificado: Substâncias não classificadas em termos de irritação ocular (categoria 2 do sistema GHS da ONU) nem de lesões oculares graves (categoria 1 do sistema GHS da ONU). Designação utilizada indistintamente com a classificação «nenhuma categoria no sistema GHS da ONU».

Amostra de controlo positiva: Replicado que contém todos os componentes do sistema de ensaio e foi tratado com um produto químico que comprovadamente induz reação positiva. Para que possa determinar-se a variabilidade, ao longo do tempo, da reação a esta amostra de controlo, essa reação não deve ser excessivamente forte.

Fiabilidade: Medida em que, utilizando o mesmo protocolo, um método de ensaio pode ser continuadamente reproduzido no mesmo laboratório e em laboratórios diferentes. A fiabilidade é avaliada com base nos valores calculados das reprodutibilidades intralaboratorial e interlaboratorial, bem como da repetibilidade intralaboratorial.

Efeitos oculares reversíveis: Ver «Irritação ocular» e «Categoria 2 do sistema GHS da ONU».

Lesões oculares graves: Lesão do tecido ocular ou degradação grave da visão em consequência da aplicação do produto químico em estudo na superfície anterior do olho, não totalmente reversível nos 21 dias após a aplicação. Este termo e «efeitos oculares irreversíveis» ou «categoria 1 do sistema GHS da ONU» (4) são utilizados indistintamente.

Microscópio com lâmpada de fenda: Instrumento utilizado para examinar diretamente uma imagem estereoscópica saliente do olho com a ampliação de um microscópio binocular. No método de ensaio ICE, este instrumento é utilizado para observar as estruturas anteriores dos olhos de frango e para medir objetivamente a espessura da córnea com um dispositivo de medição de profundidade incorporado.

Amostra de controlo do solvente/excipiente: Amostra não-tratada que contém todos os componentes do sistema de ensaio, incluindo o solvente ou excipiente, e é ensaiada, juntamente com as amostras tratadas com o produto químico em estudo e as outras amostras de controlo, para estabelecer a linha de base de reação para as amostras tratadas com o produto químico em estudo, dissolvido no mesmo solvente ou excipiente. Quando ensaiada em paralelo com uma amostra de controlo negativa, esta amostra também permite determinar se o solvente ou excipiente interage com o sistema de ensaio.

Substância: Elemento químico ou composto de um elemento químico, no estado natural ou obtido por qualquer processo de produção, incluindo qualquer aditivo necessário para preservar a estabilidade do produto e qualquer impureza derivada do processo utilizado, mas excluindo solventes que possam ser separados sem afetar a estabilidade da substância nem lhe modificar a composição (4).

Agente tensioativo: Substância, como um detergente, capaz de reduzir a tensão superficial de líquidos, permitindo-lhes formar espumas ou penetrar em sólidos; igualmente designado por «agente molhante».

▼M7

Abordagem descendente: Metodologia por etapas utilizada para produtos químicos que se suspeite causarem lesões oculares graves; inicia-se com a determinação de produtos químicos que induzam lesões oculares graves (resultado positivo) a partir de outros produtos químicos (resultado negativo).

Produto químico em estudo: Qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado este método de ensaio.

Estratégia de ensaio sequencial por etapas: Estratégia sequencial de ensaio em que, seguindo uma ordem estabelecida, se avalia toda a informação disponível sobre o produto químico em estudo, por um processo baseado na ponderação da suficiência da prova em cada etapa, com o objetivo de determinar se há informação suficiente para uma decisão de classificação de perigosidade antes de passar à etapa seguinte. Se a informação existente possibilitar a atribuição de um potencial de irritação ao produto químico em estudo, não serão necessários mais ensaios. Se a informação existente não possibilitar a atribuição de um potencial de irritação ao produto químico em estudo, procede-se a uma série de ensaios sequenciais em animais até ser possível atribuir uma classificação inequívoca.

Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS): Sistema (designado em inglês por *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals*) que propõe a classificação dos produtos químicos (substâncias e misturas) em função de tipos e níveis normalizados de perigos físicos, sanitários e ambientais e trata ainda dos elementos de comunicação correspondentes, como pictogramas, palavras-sinal, advertências de perigo, recomendações de prudência e fichas de dados de segurança, de modo a transmitir informações sobre os efeitos indesejáveis do produto em causa com vista à proteção das pessoas (empregadores, trabalhadores, transportadores, consumidores, pessoal dos serviços de emergência etc.) e do ambiente (4).

Categoria 1 do sistema GHS da ONU: Ver «Lesões oculares graves» e/ou «Efeitos oculares irreversíveis».

Categoria 2 do sistema GHS da ONU: Ver «Irritação ocular» e/ou «Efeitos oculares reversíveis».

Nenhuma categoria no sistema GHS da ONU: Substâncias que não preenchem os requisitos da classificação nas categorias 1 ou 2 (2A ou 2B) do sistema GHS da ONU. Este termo e o termo «não-classificado» são utilizados indistintamente.

Método de ensaio validado: Método de ensaio relativamente ao qual foram concluídos estudos de validação com vista a determinar a sua adequação (incluída a exatidão) e a sua fiabilidade para um determinado fim. Importa referir que um método de ensaio validado pode não ser suficientemente exato e fiável para se considerar aceitável para o fim pretendido.

Ponderação da suficiência da prova: Processo que consiste em ponderar os pontos fortes e os pontos fracos dos vários elementos de informação para tirar conclusões fundamentadas sobre o potencial de perigosidade do produto químico.

▼M7

Apêndice 2

PRODUTOS QUÍMICOS RECOMENDADOS PARA DEMONSTRAÇÃO DE COMPETÊNCIA TÉCNICA NO MÉTODO DE ENSAIO EM OLHOS DE FRANGO ISOLADOS (ICE)

Antes de um método de ensaio conforme ao presente método passar a ser utilizado por rotina, os laboratórios devem comprovar a sua competência técnica identificando corretamente a classificação de perigosidade ocular dos 13 produtos químicos recomendados no quadro 1. Estes produtos químicos foram selecionados de modo a representarem a gama de reações de perigo ocular obtidas no ensaio ocular *in vivo* no coelho (TG 405) (17), com base no sistema de classificação GHS da ONU (categorias 1, 2A, 2B ou nenhuma categoria no sistema GHS da ONU) (4) (6). Outros critérios de seleção foram a disponibilidade do produto químico no comércio, a existência de dados de referência *in vivo* de alta qualidade e a existência de dados *in vitro* de alta qualidade pelo método ICE. O *Streamlined Summary Document* (5) e os *Background Review Documents* do ICCVAM relativos ao método de ensaio ICE (9) contêm dados de referência.

Quadro 1

Produtos químicos recomendados para demonstração de competência técnica no método ICE

Produto químico	N.º CAS (CASRN)	Classe química (1)	Fase	Classificação *in vivo* (2)	Classificação *in vitro* (3)
Cloreto de benzalcónio (5 %)	8001-54-5	Sal de amónio quaternário	Líquida	Categoria 1	Categoria 1
Clorexidina	55-56-1	Amina, amidina	Sólida	Categoria 1	Categoria 1
Ácido dibenzoil-L-tartárico	2743-38-6	Ácido carboxílico, éster	Sólida	Categoria 1	Categoria 1
Imidazole	288-32-4	Composto heterocíclico	Sólida	Categoria 1	Categoria 1
Ácido tricloroacético (30 %)	76-03-9	Ácido carboxílico	Líquida	Categoria 1	Categoria 1
Cloreto de 2,6-diclorobenzoílo	4659-45-4	Halogeneto de acilo	Líquida	Categoria 2A	Não é possível nenhuma previsão (4)
Nitrato de amónio	6484-52-2	Sal inorgânico	Sólida	Categoria 2A (5)	Não são possíveis previsões (4)
2-Metilacetoacetato de etilo	609-14-3	Cetona, Éster	Líquida	Categoria 2 B	Não são possíveis previsões (4)
Sulfóxido de dimetilo	67-68-5	Composto orgânico sulfurado	Líquida	Nenhuma categoria	Nenhuma categoria
Glicerol	56-81-5	Álcool	Líquida	Nenhuma categoria	Nenhuma categoria (limite)
Metilciclopentano	96-37-7	Hidrocarboneto (cíclico)	Líquida	Nenhuma categoria	Nenhuma categoria
n-Hexano	110-54-3	Hidrocarboneto (acíclico)	Líquida	Nenhuma categoria	Nenhuma categoria

▼**M7**

Produto químico	N.º CAS (CASRN)	Classe química ([1])	Fase	Classificação *in vivo* ([2])	Classificação *in vitro* ([3])
Triacetina	102-76-1	Lípido	Líquida	Não classificado	Nenhuma categoria

Abreviaturas: CASRN = Número de registo do *Chemical Abstracts Service*.

([1]) Os produtos químicos foram inseridos em classes químicas segundo um sistema normalizado, com base nos *Medical Subject Headings* («classificadores de temas médicos», MeSH) da Biblioteca Nacional de Medicina dos Estados Unidos da América (http//www.nlm.nih.gov/mesh).

([2]) Com base nos resultados do ensaio ocular *in vivo* no coelho (TG 405 da OCDE) e no sistema GHS da ONU (4) (6).

([3]) Com base nos resultados obtidos pelo método ICE, como se refere no quadro 6.

([4]) Combinação de pontuações obtidas pelo método ICE diversa das indicadas no quadro 6 para as classificações «nenhuma categoria» e «categoria 1» do sistema GHS da ONU (ver o quadro 6).

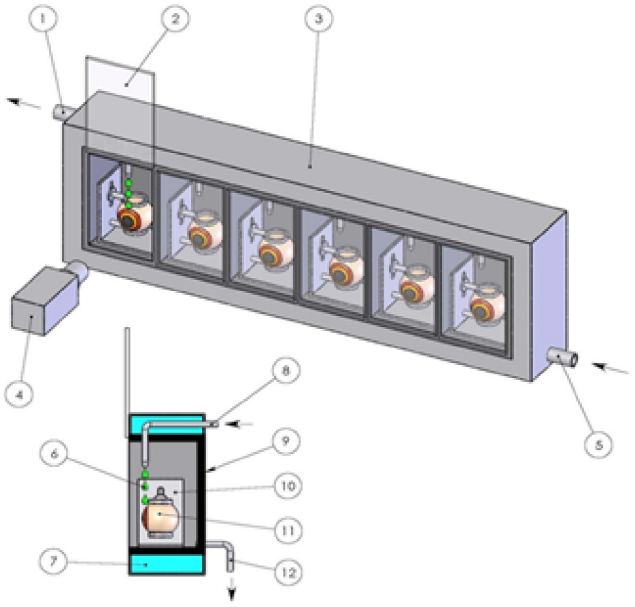
([5]) A classificação na categoria 2A ou 2B depende da interpretação do critério do sistema GHS da ONU para distinguir estas categorias: se para a classificação 2A poder ser atribuída é necessário que 1 em 3 ou que 2 em 3 animais exibam efeitos ao sétimo dia. O estudo *in vivo* incidiu em 3 animais. Todos os animais recuperaram para a pontuação 0 ao sétimo dia ou antes, em todos os parâmetros, exceto a vermelhidão da conjuntiva num dos animais. Ao sétimo dia, este animal apresentava vermelhidão da conjuntiva com pontuação 1; ao décimo dia, estava totalmente recuperado.

▼M7

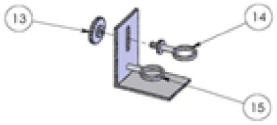
Apêndice 3

DIAGRAMAS DOS SUPORTES OCULARES E DO APARELHO DE SUPERFUSÃO PARA O MÉTODO ICE

(Ver em Burton et al. (18) uma descrição genérica dos suportes oculares e do aparelho de superfusão para o método ICE)



CROSS SECTION COMPARTMENT



EYE HOLDER

Item	Descrição	Item	Descrição
1	Saída de água tépida	9	Compartimento
2	Portinhola deslizante	10	Suporte ocular
3	Aparelho de superfusão	11	Olho de frango
4	Instrumento de medição ótica	12	Saída de solução salina
5	Entrada de água tépida	13	Parafuso de regulação
6	Solução salina	14	Braço superior regulável
7	Água tépida	15	Braço inferior fixo
8	Entrada de solução salina		

▼M7

B.49. ENSAIO *IN VITRO* DE MICRONÚCLEOS EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS

INTRODUÇÃO

Este método de ensaio é equivalente ao *Test Guideline* 487 (2016) da OCDE. Faz parte de uma série de métodos de ensaio sobre toxicologia genética. Está disponível um documento da OCDE que fornece informações sucintas sobre ensaios de toxicologia genética e resume as alterações recentemente efetuadas às orientações da OCDE nesse domínio (1).

O ensaio *in vitro* de micronúcleos é um ensaio de genotoxicidade para a deteção de micronúcleos no citoplasma de células em interfase. Os micronúcleos podem provir de fragmentos cromossómicos acêntricos (ou seja, sem centrómero) ou de cromossomas completos incapazes de migrar para os polos durante a anáfase da divisão celular. O ensaio *in vitro* de micronúcleos é, portanto, um método *in vitro* que proporciona uma base alargada para a investigação *in vitro* de potenciais de indução de danos cromossómicos, pois permite detetar aneugénios e clastogénios (2) (3) em células que se tenham dividido durante ou após a exposição ao produto químico em estudo (mais pormenores no ponto 13). Os micronúcleos representam danos transmitidos às células-filhas, ao passo que as aberrações cromossómicas contadas nas células em metáfase podem não ser transmitidas. Em ambos os casos, as alterações podem não ser compatíveis com a sobrevivência das células.

Este método de ensaio admite a utilização de protocolos que recorrem ou não ao inibidor de polimerização da actina «citocalasina B» (ou «citoB»). A adição de citocalasina B antes da mitose leva à formação de células binucleadas e, portanto, permite identificar e analisar micronúcleos unicamente nas células que sofreram uma mitose (4) (5). Este método de ensaio também admite a utilização de protocolos sem bloqueio da citocinese, desde que a população celular analisada tenha comprovadamente sofrido mitose.

Além da utilização do ensaio *in vitro* de micronúcleos para identificar produtos químicos indutores da formação de micronúcleos, o recurso à marcação imunoquímica dos cinetócoros ou à hibridação com sondas centroméricas/teloméricas (hibridação fluorescente *in situ* ou «FISH») pode também fornecer informações adicionais sobre os mecanismos de indução de danos cromossómicos e de formação de micronúcleos (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17). Pode recorrer-se às referidas marcação ou hibridação sempre que se verifique um aumento da formação de micronúcleos e o investigador pretenda determinar se este se deve a clastogénese, a aneugénese ou a ambas.

Uma vez que é possível determinar, com relativa objetividade, os micronúcleos das células em interfase, o pessoal do laboratório apenas precisa de determinar o número de células binucleadas, quando se utiliza citocalasina B, e a incidência de células micronucleadas, em todos os casos. Por conseguinte, as contagens nas lâminas podem ser feitas com relativa rapidez e as análises podem ser automatizadas. É assim possível efetuar contagens a milhares — e já não centenas — de células por tratamento, aumentando as potencialidades do ensaio. Por outro lado, uma vez que podem formar-se micronúcleos devido a cromossomas retardatários («*lagging*»), é possível detetar agentes indutores de aneuploidia, que são difíceis de estudar em ensaios convencionais de aberrações cromossómicas (por exemplo segundo o capítulo B.10 deste anexo) (18). Todavia, sem recurso a técnicas especiais, como o método FISH referido no ponto 4, o ensaio *in vitro* de micronúcleos descrito neste método de ensaio não permite distinguir os produtos químicos indutores de alterações do número de cromossomas e/ou de alterações da ploidia dos indutores de clastogenicidade.

O ensaio *in vitro* de micronúcleos funciona bem e pode ser realizado numa grande variedade de tipos de células, na presença ou na ausência de citocalasina B. Há numerosos dados que confirmam a validade deste ensaio com vários tipos de células (culturas de linhagens celulares ou culturas primárias) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34) (35) (36). É o caso, nomeadamente, dos estudos internacionais de validação coordenados pela *Société Française de Toxicologie Génétique* (SFTG) (19) (20) (21) (22) (23) e

▼M7

dos relatórios do *International Workshop on Genotoxicity Testing* (5) (17). Os dados disponíveis foram também reavaliados num estudo de validação retrospetivo de suficiência de prova efetuado pelo Centro Europeu de Validação de Métodos Alternativos (ECVAM) da Comissão Europeia, tendo o ESAC (Comité Científico Consultivo do ECVAM) (37) (38) (39) considerado o método de ensaio cientificamente válido.

O ensaio *in vitro* de micronúcleos em células de mamíferos pode utilizar culturas de linhagens celulares ou culturas primárias de células humanas ou de roedores. Uma vez que a frequência de fundo de micronúcleos influencia a sensibilidade do ensaio, recomenda-se a utilização de tipos de células cuja frequência de fundo de formação de micronúcleos seja definida e estável. As células utilizadas devem ser selecionadas com base na sua capacidade de crescimento em cultura, na estabilidade do cariótipo (incluindo o número de cromossomas) e na frequência da formação espontânea de micronúcleos (40). Os dados atualmente disponíveis não permitem efetuar recomendações sólidas, mas sugerem que, ao avaliar os perigos químicos, é importante considerar o estado *p53*, a estabilidade genética (do cariótipo), a capacidade de reparação do ADN e a origem (roedores ou humanos) das células escolhidas para a realização do ensaio. Dada a evolução constante dos conhecimentos nesta área, os utilizadores do presente método de ensaio são, assim, incentivados a ponderar a influência destas e de outras características celulares no desempenho da linhagem celular na deteção de indução da formação de micronúcleos.

Estabelecem-se definições no apêndice 1.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES

Os ensaios *in vitro* necessitam, normalmente, de uma fonte exógena de ativação metabólica, a menos que as células sejam metabolicamente competentes em relação aos produtos químicos em estudo. O sistema exógeno de ativação metabólica não reproduz inteiramente as condições *in vivo*. Deve ter-se o cuidado de evitar condições suscetíveis de gerar falsos resultados positivos que não espelhem a genotoxicidade do produto químico em estudo, condições essas que incluem alterações do pH (41) (42) (43) ou da pressão osmótica, interações com o meio de cultura das células (44) (45) ou níveis excessivos de citotoxicidade (ver o ponto 29).

Para analisar a indução de micronúcleos, é essencial que tanto as culturas tratadas como as não-tratadas tenham sofrido mitose. A etapa mais informativa para a contagem de micronúcleos corresponde às células que tenham sofrido uma mitose durante ou após o tratamento com o produto químico em estudo. No caso dos nanomateriais fabricados, são necessárias adaptações específicas do método de ensaio, que não são descritas no presente método.

Antes da aplicação do método de ensaio a uma mistura para obter dados relacionados com exigências normativas, importa ponderar se — e, em caso afirmativo, por que motivo — o método pode fornecer resultados adequados para o efeito. Essa ponderação não é necessária se exigências normativas impuserem o ensaio da mistura em causa.

PRINCÍPIO DO ENSAIO

Expõem-se culturas de células humanas ou de outros mamíferos ao produto químico em estudo, quer em presença de uma fonte exógena de ativação metabólica quer sem essa fonte, a menos que se utilizem células com capacidade metabólica adequada (ver ponto 19).

Durante ou após a exposição ao produto químico em estudo, cultivam-se as células por um período suficiente para que ocorram danos nos cromossomas ou outros efeitos no ciclo/divisão celular conducentes à formação de micronúcleos nas células em interfase. Para indução de aneuploidia, o produto químico em estudo deve normalmente estar presente durante a mitose. Colhem-se células em interfase, coloram-se e analisam-se, para pesquisar a presença de micronúcleos. Idealmente, só devem contar-se micronúcleos em células que tenham sofrido mitose completa durante a exposição ao produto químico em estudo ou

▼M7

durante o período pós-tratamento, caso exista. Nas culturas que tenham sido tratadas com um bloqueador da citocinese, basta, para isso, contar apenas as células binucleadas. Na ausência de bloqueador da citocinese, é importante demonstrar (com base no aumento da população celular) a probabilidade elevada de que as células analisadas se tenham dividido durante ou após a exposição ao produto químico em estudo. Em todos os protocolos, é importante demonstrar a ocorrência de proliferação celular, tanto nas culturas tratadas como nas culturas de controlo, determinando-se o grau de citotoxicidade ou de citóstase induzido pelo produto químico em estudo em todas as culturas nas quais se procede à contagem de micronúcleos.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Células

Podem utilizar-se linfócitos primários cultivados de sangue periférico humano (ou de outros mamíferos) (7) (20) (46) (47) e uma série de linhagens celulares de roedores, como CHO, V79, CHL/IU e L5178Y, ou de linhagens celulares humanas, como a TK6 (19) (20) (21) (22) (23) (26) (27) (28) (29) (31) (33) (34) (35) (36) (ver o ponto 6). Já se utilizaram outras linhagens celulares em ensaios de micronúcleos, como HT29 (48), Caco-2 (49), HepaRG (50) (51), células HepG2 (52) (53), A549 e células embrionárias primárias de hamster sírio (*Mesocricetus auratus*) (54), as quais não foram, porém, ainda completamente validadas. A eventual utilização desses tipos de células ou linhagens celulares terá de ser justificada, com base no seu desempenho comprovado no ensaio, em conformidade com a secção «Critérios de aceitabilidade» Comprovou-se que a citocalasina B pode influenciar o crescimento das células L5178Y, pelo que não se recomenda a sua utilização com esta linhagem celular (23). Se se utilizarem células primárias, deve ponderar-se, sempre que possível e por razões de bem-estar animal, a utilização de células de origem humana, obtidas em conformidade com os princípios éticos e a regulamentação nesse domínio.

Os linfócitos de sangue humano periférico devem provir de indivíduos jovens (18-35 anos), não-fumadores, que não sofram de nenhuma doença nem tenham estado expostos recentemente a níveis de agentes genotóxicos (por exemplo produtos químicos ou radiações ionizantes) suscetíveis de aumentar a incidência de base de células micronucleadas. Desta forma, assegura-se uma incidência de base de células micronucleadas baixa e regular. A incidência de base de células micronucleadas aumenta com a idade, uma tendência mais pronunciada no sexo feminino do que no sexo masculino (55). Se se reunirem para utilização células de mais do que um dador, deve indicar-se o número de dadores. É necessário demonstrar que as células se dividiram, desde o início do tratamento com o produto químico em estudo, até à colheita das células. Uma vez que a sensibilidade dos estádios celulares ao produto químico em estudo pode não ser conhecida, mantêm-se as culturas celulares numa fase de crescimento exponencial (linhagens celulares) ou estimula-se a divisão das células (culturas primárias de linfócitos), de forma que a exposição ocorra em diversos estádios do ciclo celular. Geralmente, as células primárias que necessitam de ser estimuladas com agentes mitogénicos para se dividirem já não estão sincronizadas durante o período de exposição ao produto químico em estudo (caso, por exemplo, dos linfócitos humanos após 48 horas de estimulação mitogénica). Não se recomenda a utilização de células sincronizadas durante o tratamento com o produto químico em estudo, embora essa utilização possa ser aceitável, caso se justifique.

Meios e condições de cultura

Devem manter-se as culturas em meios de cultura e condições de incubação adequados (tipo de recipiente, atmosfera humidificada com concentração de CO_2 de 5 %, se necessário, temperatura de 37 °C). As linhagens celulares devem ser periodicamente verificadas quanto à estabilidade do número modal de cromossomas e à ausência de contaminação por micoplasmas, não devendo as células ser utilizadas caso se verifique que estão contaminadas ou que o número modal de cromossomas se alterou. A duração normal do ciclo celular das linhagens celulares ou das culturas primárias utilizadas no laboratório de ensaio deve ser conhecida e ser compatível com as características celulares publicadas.

▼M7

Preparação das culturas

Linhagens celulares: repicam-se células de culturas de reserva, inoculam-se num meio de cultura, com densidade tal que as células em suspensão ou em monocamadas continuem a crescer exponencialmente até ao momento da colheita (por exemplo, deve evitar-se a confluência no caso do crescimento de células em monocamadas).

Linfócitos: cultiva-se (por exemplo durante 48 horas, no caso dos linfócitos humanos) sangue integral, tratado com um anticoagulante (por exemplo heparina), ou linfócitos separados, na presença de um agente mitogénico (por exemplo fito-hemaglutinina — PHA –, no caso dos linfócitos humanos) destinado a induzir a divisão celular antes da exposição ao produto químico em estudo e à citocalasina B.

Ativação metabólica

Se se utilizarem células com capacidade metabólica endógena inadequada, será necessário utilizar sistemas metabolizantes exógenos. O sistema mais geralmente utilizado e normalmente recomendado, a menos que se justifique utilizar outro, é uma fração pós-mitocondrial reforçada com cofator (S9), preparada a partir de fígados de roedores (em geral, ratos) tratados com agentes de indução enzimática como Aroclor 1254 (56) (57) ou uma mistura de fenobarbital e b-naftoflavona (58) (59) (60). Esta última combinação não é contrária à Convenção de Estocolmo sobre Poluentes Orgânicos Persistentes (61) e comprovou-se ser tão eficaz na indução de oxidases de função mista como o Aroclor 1254 (58) (59) (60). A fração S9 é habitualmente utilizada em concentrações na gama de 1 % a 2 % (v/v), mas pode ser aumentada para 10 % (v/v) no meio de ensaio final. Durante o tratamento, deve evitar-se a utilização de produtos que reduzam o índice mitótico, em especial complexantes de cálcio (62). A classe de produtos químicos em estudo pode influenciar a escolha do tipo e da concentração do sistema exógeno de ativação metabólica ou do indutor metabólico utilizado.

Preparação do produto químico em estudo

Os produtos químicos sólidos devem ser adicionados a solventes adequados e, se necessário, ser diluídos antes do tratamento das células. Os produtos químicos líquidos podem ser adicionados diretamente ao sistema de ensaio e/ou ser diluídos antes de serem utilizados no tratamento do sistema de ensaio. Para o ensaio de produtos químicos gasosos ou voláteis, devem ser efetuadas alterações adequadas aos protocolos normalizados, como o tratamento em recipientes de cultura hermeticamente fechados (63) (64) (65). A preparação do produto químico em estudo deve ocorrer imediatamente antes do tratamento, a menos que dados de estabilidade demonstrem que o produto pode ser armazenado.

Condições de realização do ensaio

Solventes

O solvente deve ser escolhido de modo a otimizar a solubilidade dos produtos químicos em estudo sem afetar negativamente a realização do ensaio (por exemplo por alteração do crescimento celular, afetação da integridade do produto químico em estudo, reação com os recipientes de cultura ou comprometimento do sistema de ativação metabólica). Sempre que possível, recomenda-se a utilização de um solvente (ou meio de cultura) aquoso. A água e o sulfóxido dimetílico (DMSO), por exemplo, são solventes consagrados. Em geral, os solventes orgânicos não devem exceder 1 % (v/v). Caso se dissolva a citocalasina B em DMSO, a quantidade total de solvente orgânico utilizada para o produto químico em estudo e para a citocalasina B não deve exceder 1 % (v/v); caso contrário, será necessário recorrer a amostras de controlo do solvente para verificar se, na percentagem utilizada, o solvente orgânico tem efeitos adversos. Os solventes aquosos (soluções salinas ou água) não devem exceder 10 % (v/v) no meio de tratamento final. Se se utilizarem solventes cujas propriedades não se encontrem totalmente elucidadas (por exemplo: etanol ou acetona), devem ser fornecidos dados que comprovem que esses solventes são compatíveis com o produto químico em estudo e com o sistema de ensaio e não são genotóxicos à concentração

▼M7

utilizada. Na ausência de dados comprovativos, é importante incluir amostras de controlo não-tratadas (ver o apêndice 1), bem como amostras de controlo do solvente, para demonstrar que o solvente escolhido não induz efeitos deletérios ou cromossómicos (por exemplo: aneuploidia ou clastogenicidade).

Utilização de citocalasina B como bloqueador da citocinese

Um dos aspetos mais importantes a ponderar no desempenho do ensaio *in vitro* de micronúcleos é o imperativo de garantir que as células sujeitas à contagem sofreram mitose completa durante o tratamento ou durante o eventual período de incubação pós-tratamento. Deve, portanto, circunscrever-se a contagem de micronúcleos às células que sofreram mitose durante ou após o tratamento. A citocalasina B tem sido o agente mais utilizado para bloquear a citocinese, pois inibe a agregação da actina e impede assim a separação das células-filhas após a mitose, conduzindo à formação de células binucleadas (6) (66) (67). Caso se utilize citocalasina B, pode medir-se simultaneamente o efeito do produto químico em estudo na cinética da proliferação celular. Quando se utilizam linfócitos humanos, é necessário recorrer a citocalasina B como bloqueador da citocinese, porque, caso contrário, a duração do ciclo celular variaria de dador para dador e nem todos os linfócitos responderiam à PHA. Não é obrigatório utilizar citocalasina B no caso de outros tipos de células, caso possa comprovar-se que as células utilizadas se dividiram conforme se explica no ponto 27. Normalmente, tampouco se utiliza citocalasina B quando se recorre a métodos de citometria de fluxo para avaliar a formação de micronúcleos nas amostras.

O laboratório determina, para cada tipo de célula, a concentração de citocalasina B necessária para otimizar a frequência de células binucleadas nas culturas de controlo do solvente, concentração essa que, comprovadamente, deve gerar um número de células binucleadas suficiente para a contagem. A concentração adequada de citocalasina B situa-se normalmente entre 3 e 6 μg/ml (19).

Medição da proliferação celular e da citotoxicidade e escolha das concentrações de tratamento

Quando se determina a concentração máxima a ensaiar do produto químico em estudo, devem ser evitadas concentrações suscetíveis de gerar respostas positivas falsas, como as que produzam citotoxicidade excessiva (ver o ponto 29), precipitações no meio de cultura (ver o ponto 30) ou alterações pronunciadas do pH ou da pressão osmótica (ver o ponto 9). Se, ao ser adicionado, o produto químico em estudo causar uma alteração pronunciada do pH do meio, o pH pode ser ajustado por tamponamento do meio de tratamento final, de modo a evitar falsos resultados positivos e manter condições de cultura adequadas.

Efetuam-se medições da proliferação celular para garantir um número suficiente de células tratadas que sofreram mitose durante o ensaio e que os tratamentos são efetuados a níveis adequados de citotoxicidade (ver o ponto 29). A citotoxicidade deve ser determinada na experiência principal com e sem ativação metabólica, utilizando um indicador apropriado de crescimento e morte celular (ver os pontos 26 e 27). Embora a avaliação da citotoxicidade num ensaio preliminar possa ser útil para definir melhor as concentrações a utilizar no ensaio principal, esse ensaio preliminar não é obrigatório. Se for efetuado, não deve substituir a determinação da citotoxicidade no ensaio principal.

O tratamento das culturas com citocalasina B e a determinação das frequências relativas de células mononucleadas, binucleadas e plurinucleadas na cultura celular constituem um método rigoroso de quantificação do efeito do tratamento na proliferação celular e da atividade citotóxica e citostática do mesmo (6), garantindo que apenas são contadas ao microscópio células que se dividiram durante ou após o tratamento. Recomenda-se a medição do índice de proliferação com

▼M7

citocinese bloqueada (CBPI) (6) (27) (68) ou do índice de replicação (IR) de, pelo menos, 500 células por cultura (ver as fórmulas respetivas no apêndice 2), para estimar a atividade citotóxica e citostática do tratamento por comparação dos valores obtidos para as culturas tratadas e para as culturas de controlo. A avaliação de outros indicadores de citotoxicidade (por exemplo: integridade celular, apoptose, necrose, contagem das células em metáfase, ciclo celular) pode fornecer informações úteis, mas não pode substituir-se à do CBPI nem à do IR.

Nos estudos em que não se recorra à citocalasina B, é necessário demonstrar que as células da cultura se dividiram, de modo que a divisão de uma parte substancial das células contadas tenha ocorrido durante ou após o tratamento com o produto químico em estudo; caso contrário, podem surgir respostas negativas falsas. Recomenda-se a medição da duplicação da população em termos relativos (RPD) ou do aumento relativo da contagem celular (RICC) para estimar a atividade citotóxica e citostática do tratamento (17) (68) (69) (70) (71) (ver as fórmulas no apêndice 2). Quando os tempos de amostragem forem dilatados — por exemplo: duração do tratamento equivalente a 1,5 a 2 vezes a duração normal do ciclo celular e colheita uma vez transcorrido um período adicional igualmente equivalente a 1,5 a 2 vezes a duração normal do ciclo celular, daí resultando, no total, tempos de amostragem superiores a 3 a 4 vezes a duração normal do ciclo celular (ver os pontos 38 e 39) –, a duplicação da população em termos relativos pode subestimar a citotoxicidade (71). Nestas condições, o RICC poderá constituir uma melhor estimativa, mas a avaliação da citotoxicidade após um período equivalente a 1,5 a 2 vezes a duração normal do ciclo celular não deixará de proporcionar uma estimativa útil. A avaliação de outros marcadores de citotoxicidade ou de citóstase (por exemplo: integridade celular, apoptose, necrose, contagem das células em metáfase, índice de proliferação, ciclo celular, pontes nucleoplásmicas ou protrusões nucleares) pode fornecer informações úteis adicionais, mas não pode substituir-se à da RPD nem à do RICC.

Devem ser avaliadas, pelo menos, três concentrações de ensaio (não incluindo as amostras de controlo positivo nem as amostras de controlo do solvente) que cumpram os critérios de aceitabilidade (citotoxicidade adequada, número de células etc.). Independentemente do tipo de células (linhagens celulares ou culturas primárias de linfócitos), podem ser utilizados, para cada concentração ensaiada, replicados da cultura tratada ou uma única cultura tratada. Embora seja aconselhável a utilização de culturas em duplicado, uma cultura única é igualmente aceitável, desde que se conte o mesmo número total de células na cultura única e nas culturas em duplicado. O recurso a uma única cultura é particularmente importante quando se avaliam mais de três concentrações (ver os pontos 44 e 45). Os resultados obtidos a uma dada concentração com as culturas replicadas independentes podem ser agrupados para a análise de dados. No caso dos produtos químicos que demonstrem pouca ou nenhuma citotoxicidade, são normalmente adequadas concentrações espaçadas por um fator de 2 a 3. Quando se observa citotoxicidade, as concentrações escolhidas para o ensaio devem definir uma gama com início na concentração citotóxica descrita no ponto 29 e que inclua concentrações às quais se observe toxicidade moderada e pouca ou nenhuma citotoxicidade. Muitos produtos químicos estudados apresentam curvas concentração-resposta com declive acentuado, pelo que, para obter dados a citotoxicidade baixa e moderada ou para analisar em pormenor a relação dose/resposta, será necessário recorrer a concentrações menos espaçadas e/ou a mais de três concentrações (da cultura única ou dos replicados), em especial nas situações em que for necessário repetir o ensaio (ver o ponto 60).

Se a concentração máxima se basear na citotoxicidade, a concentração mais elevada deve visar 55 % ± 5 % de citotoxicidade, utilizando os parâmetros de citotoxicidade recomendados (ou seja, redução do RICC e da RPD, no caso das linhagens celulares sem utilização de citocalasina B, e redução do CBPI ou do IR, quando se utilizar citocalasina B, para 45 % ± 5 % da amostra de controlo negativa ensaiada em paralelo) (72). Os resultados positivos observados apenas no extremo superior da gama de 55 % ± 5 % de citotoxicidade devem ser interpretados com precaução (71).

▼M7

No caso de produtos químicos pouco solúveis não-citotóxicos a concentrações inferiores à concentração insolúvel mínima, a maior concentração analisada deve gerar, no final do tratamento com o produto químico em estudo, turbidez ou um precipitado visível a olho nu ou com auxílio de um microscópio invertido. Mesmo no caso de se observar citotoxicidade acima da menor concentração insolúvel, é conveniente ensaiar uma única concentração que gere turbidez ou um precipitado visível, porque o precipitado pode induzir efeitos falsos. À concentração que gera um precipitado, devem ser tomados os devidos cuidados para assegurar que este não interfere na realização do ensaio (por exemplo em termos de coloração ou de contagem). Neste contexto, pode ser útil determinar a solubilidade no meio de cultura antes do ensaio.

Se não se observar precipitação nem citotoxicidade condicionante, a maior concentração ensaiada deve corresponder à menor das seguintes concentrações: 10 mM, 2 mg/ml ou 2 μl/ml (73) (74) (75). Se o produto químico em estudo não for de composição definida — caso, por exemplo, das substâncias de composição desconhecida ou variável, de produtos de reação complexos ou de matérias biológicas, os ditos «UVCB» (76), de extratos ambientais etc. –, a concentração máxima, na ausência de citotoxicidade suficiente, pode ter de ser mais elevada (por exemplo 5 mg/ml), para aumentar a concentração de cada componente. Importa, contudo, notar que estes requisitos podem diferir no caso de medicamentos para uso humano (93).

Amostras de controlo

Para cada colheita, devem ser ensaiadas amostras de controlo negativas em paralelo (ver o ponto 21), procedendo-se do mesmo modo que no caso da exposição ao produto químico em estudo, mas expondo as células em cultura apenas ao solvente e ao meio.

São necessárias amostras de controlo positivo correspondentes para demonstrar a capacidade do laboratório de identificar clastogénios e aneugénios nas condições do protocolo de ensaio, bem como a eficácia do sistema exógeno de ativação metabólica (se for caso disso). O quadro 1 apresenta exemplos de produtos químicos de controlo positivo. Se tal se justificar, podem ser utilizados outros produtos químicos de controlo positivo.

Presentemente, não se conhecem aneugénios que necessitem de ativação metabólica para manifestarem atividade genotóxica (17). Dado que os ensaios de toxicidade genética *in vitro* em células de mamíferos estão suficientemente normalizados no que respeita a tratamentos paralelos de curta duração com e sem ativação metabólica por período idêntico, o recurso a produtos químicos de controlo positivo pode limitar-se a um clastogénio que necessite de ativação metabólica. Neste caso, uma resposta clastogénica a um único produto químico de controlo positivo será reveladora da atividade do sistema de ativação metabólica e da reatividade do sistema de ensaio. No entanto, deve utilizar-se um produto químico de controlo positivo no caso dos tratamentos prolongados (sem S9), dado que a duração do tratamento diferirá da do ensaio com ativação metabólica. Se, para um tratamento de curta duração com e sem ativação metabólica, se utilizar um clastogénio como produto químico de controlo positivo único, deve utilizar-se um aneugénio para um tratamento prolongado sem ativação metabólica. No caso das células metabolicamente competentes que não necessitam de S9, deve utilizar-se um produto químico de controlo positivo para a clastogenicidade e outro para a aneugenicidade.

Cada produto químico de controlo positivo deve ser utilizado a uma ou mais concentrações às quais se preveja um aumento detetável e reprodutível relativamente à linha de fundo para demonstrar a sensibilidade do sistema de ensaio (evidenciando efeitos claros, mas não imediatamente reveladores da identidade das lâminas codificadas à pessoa que efetua as contagens), não devendo a resposta ser comprometida por manifestações de citotoxicidade superiores aos limites especificados neste método de ensaio.

▼M7

Quadro 1

Produtos químicos de referência recomendados para avaliar a competência técnica do laboratório e para selecionar os produtos químicos de controlo positivo

Categoria	Produto químico	N.º de registo CAS
1. **Clastogénios ativos sem ativação metabólica**		
	Metanossulfonato de metilo	66-27-3
	Mitomicina C	50-07-7
	N-óxido de 4-nitroquinolina	56-57-5
	Arabinósido de citosina	147-94-4
2. **Clastogénios que necessitam de ativação metabólica**		
	Benzo[*a*]pireno	50-32-8
	Ciclofosfamida	50-18-0
3. **Aneugénios**		
	Colquicina	64-86-8
	Vimblastina	143-67-9

PROTOCOLO DE ENSAIO

Programa de tratamento

A fim de maximizar a probabilidade de deteção de ações aneugénicas ou clastogénicas num determinado estádio do ciclo celular, é importante tratar com o produto químico em estudo um número de células suficientemente representativo de todos os estádios desse ciclo. Os tratamentos devem sempre começar e terminar durante a fase de crescimento exponencial das células, as quais devem continuar a multiplicar-se até à colheita das amostras. O programa de tratamento aplicado às linhagens celulares e às culturas de células primárias pode, portanto, diferir um pouco do aplicado aos linfócitos, que necessitam de estimulação mitogénica para iniciarem o seu ciclo celular (17). Relativamente aos linfócitos, a melhor prática é iniciar o tratamento com o produto químico em estudo 44 a 48 horas após a estimulação com PHA, quando as células estiverem a dividir-se sem sincronia (6).

Os dados publicados (19) indicam que, na sua maioria, os aneugénios e os clastogénios são detetados com um tratamento curto durante 3 a 6 horas, na presença ou ausência de S9, seguido da remoção do produto químico em estudo e da colheita das amostras uma vez transcorrido um período equivalente à duração normal de 1,5 a 2,0 ciclos celulares após o início do tratamento (7).

No entanto, para uma avaliação completa, necessária para concluir por um resultado negativo, devem ser aplicadas, nos tratamentos curtos com e sem ativação metabólica e nos tratamentos longos sem ativação metabólica, as três seguintes condições experimentais (ver os pontos 56, 57 e 58):

— exposição das células ao produto químico em estudo, sem ativação metabólica, durante 3 a 6 horas; colheita das amostras uma vez transcorrido um período equivalente à duração normal de 1,5 a 2,0 ciclos celulares após o início do tratamento (19);

— exposição das células ao produto químico em estudo, com ativação metabólica, durante 3 a 6 horas; colheita das amostras uma vez transcorrido um período equivalente à duração normal de 1,5 a 2,0 ciclos celulares após o início do tratamento (19);

▼M7

— exposição contínua das células, sem ativação metabólica, até à colheita das amostras uma vez transcorrido um período equivalente à duração normal de 1,5 a 2,0 ciclos celulares.

Se a aplicação de alguma destas condições experimentais conduzir a uma resposta positiva, poderá não ser necessário investigar os outros regimes de tratamento.

Caso esteja comprovado ou se suspeite que o produto químico em estudo afeta a duração do ciclo celular (por exemplo quando se estudam análogos dos nucleósidos), sobretudo no caso de células competentes em p53 (35) (36) (77), os períodos de recuperação e de colheita de amostras podem ser prolongados no equivalente à duração normal de 1,5 a 2,0 ciclos celulares (ou seja, período total equivalente à duração de 3,0 a 4,0 ciclos celulares, após o início do tratamento curto ou longo). Estas possibilidades alternativas destinam-se a superar as situações em que se tema a eventual interação do produto químico em estudo com a citocalasina B. Se o período transcorrido até à colheita das amostra tiver sido dilatado (ou seja, tempo de cultura equivalente à duração de 3,0 a 4,0 ciclos celulares), é necessário garantir que as células ainda estejam em franca divisão. Por exemplo, o crescimento exponencial dos linfócitos pode já estar em declínio 96 horas após a estimulação, e pode haver confluência nas monocamadas celulares em cultura.

Os programas propostos para o tratamento das células resumem-se no quadro 2. Estes programas de tratamento gerais podem ser alterados (justificação necessária) em função da estabilidade ou reatividade do produto químico em estudo ou das especificidades de crescimento das células utilizadas

Quadro 2

Tratamento das células e cronologia da colheita de amostras no ensaio *in vitro* de micronúcleos

Linfócitos, células primárias e linhagens celulares tratados com aplicação de citocalasina B	+ S9 Tratamento curto	Tratamento de três a seis horas, na presença de S9; Remoção da S9 e do meio de tratamento; Adição de meio fresco e de citocalasina B; Colheita após 1,5 a 2,0 ciclos celulares normais, depois de iniciado o tratamento.
	– S9 Tratamento curto	Tratamento de três a seis horas; Remoção do meio de tratamento; Adição de meio fresco e de citocalasina B; Colheita após 1,5 a 2,0 ciclos celulares normais, depois de iniciado o tratamento.
	– S9 Tratamento prolongado	Tratamento durante período equivalente a 1,5 a 2,0 ciclos celulares normais, na presença de citocalasina B; Colheita no termo do período de tratamento.
Linhagens celulares tratadas sem aplicação de citocalasina B (Procede-se de modo idêntico ao acima descrito, exceto que não se adiciona citocalasina B.)		

No caso das culturas em monocamada, no final do tratamento de três a seis horas podem estar presentes células mitóticas (identificáveis pela sua forma arredondada e por se destacarem da superfície). Por se destacarem com facilidade, estas células podem perder-se quando se remove o meio que contém o produto químico em estudo. Caso se verifique um aumento substancial do número de células mitóticas relativamente às amostras de controlo, indicativo de provável suspensão da mitose, as células devem ser recolhidas por centrifugação e reinseridas na cultura, para que, no momento da colheita, não se percam células que estejam em mitose e, consequentemente, em risco de formação de micronúcleos ou de ocorrência de aberrações cromossómicas.

▼M7

Colheita de células e preparação das lâminas

As células de cada cultura devem ser colhidas e manipuladas separadamente. A preparação das células pode incluir um tratamento hipotónico, mas esse passo não será necessário se se puder obter uma dilatação adequada das células por outra via. Podem ser utilizadas várias técnicas na preparação das lâminas, desde que se obtenham preparações celulares de alta qualidade para a contagem. As células com citoplasma e membrana celular intactos destinam-se à pesquisa de micronúcleos e (no método com bloqueio da citocinese) a uma identificação fiável das células binucleadas.

A coloração das lâminas pode fazer-se por vários métodos: por exemplo com o corante Giemsa ou corantes fluorescentes específicos do ADN. A utilização de corantes fluorescentes adequados — por exemplo: laranja de acridina (78) ou uma combinação do corante 33258 da Hoechst e de pironina-Y (79) — pode eliminar alguns erros associados à utilização de corantes inespecíficos do ADN. Na identificação do conteúdo dos micronúcleos (se houver interesse em obter informações sobre os mecanismos de formação destes), podem ser utilizados anticorpos anticinetócoro, o método FISH com sondas de ADN pancentromérico ou a marcação *in situ* com iniciadores pancentroméricos específicos, em combinação com uma coloração de contraste adequada do ADN (os cromossomas completos adquirem coloração, os fragmentos de cromossomas acêntricos não) (16) (17). Na diferenciação entre clastogénios e aneugénios, podem ser utilizados outros métodos, cuja eficácia tenha sido demonstrada e validada. Por exemplo, no caso de determinadas linhagens celulares, a medição dos núcleos sub-2N como hipodiploidia, por meio de técnicas como a análise de imagem, a citometria de varrimento por laser ou a citometria de fluxo, também pode fornecer informações úteis (80) (81) (82). O exame da morfologia dos núcleos pode dar indicações sobre eventual aneuploidia. Um ensaio de aberrações cromossómicas a células em metáfase, de preferência no mesmo tipo de células e segundo protocolo de sensibilidade comparável, pode também ser útil para determinar se os micronúcleos se devem a cisão de cromossomas (sabendo que as perdas cromossómicas não são detetáveis nesse ensaio).

Análise

Antes da análise microscópica da frequência de micronúcleos, codificam-se todas as lâminas independentemente umas das outras, incluindo as correspondentes às amostras de controlo do solvente, às amostras de controlo não-tratadas (se forem utilizadas) e às amostras de controlo positivo. Quando se utilizam sistemas de contagem automáticos (por exemplo: citometria de fluxo, citometria de varrimento por laser ou análise de imagem), devem ser utilizadas técnicas adequadas para evitar eventuais erros sistemáticos ou enviesamentos. Independentemente dos meios automáticos utilizados na contagem dos micronúcleos, devem ser concomitantemente determinados o CBPI, o IR, a RPD e o RICC.

Nas culturas de células tratadas com citocalasina B, analisa-se a frequência de micronúcleos em, pelo menos, 2 000 células binucleadas por nível de concentração e por amostra de controlo (83), igualmente repartidas pelos replicados eventualmente utilizados. Caso haja apenas uma cultura por dose (ver o ponto 28), deve efetuar-se a contagem em, pelo menos, 2 000 células binucleadas dessa cultura (83). Se o número de células disponível para contagem, em cada nível de concentração, for substancialmente inferior a 1 000 células binucleadas por cultura (culturas em duplicado) ou substancialmente inferior a 2 000 células binucleadas (cultura única) e não se detetar um aumento significativo de micronúcleos, deve repetir-se o ensaio, utilizando mais células ou concentrações menos citotóxicas, conforme seja mais conveniente. Devem ser tomadas precauções para não se contarem células binucleadas com formas irregulares ou cujos núcleos tenham dimensões muito diferentes. Também não devem confundir-se células binucleadas e células plurinucleadas com dilatação insuficiente. Não devem pesquisar-se micronúcleos em células com mais de dois núcleos principais, cuja frequência normal de micronúcleos pode ser mais elevada (84). Admite-se a contagem das células mononucleadas se o produto químico em estudo interferir comprovadamente com a atividade da citocalasina B. Nesses casos, pode ser útil

▼M7

repetir o ensaio sem citocalasina B. A contagem das células mononucleadas, adicionalmente à contagem das células binucleadas, pode fornecer informações úteis, mas não é obrigatória (85) (86).

Nas linhagens celulares ensaiadas sem tratamento com citocalasina B, deve efetuar-se a contagem de micronúcleos em, pelo menos, 2 000 células por nível de concentração e por amostra de controlo (83), igualmente repartidas pelos replicados eventualmente utilizados. Quando se utiliza apenas uma cultura por nível de concentração (ver o ponto 28), deve efetuar-se a contagem em, pelo menos, 2 000 células dessa cultura. Se o número de células disponível para contagem, em cada nível de concentração, for substancialmente inferior a 1 000 células por cultura (culturas em duplicado) ou substancialmente inferior a 2 000 células (cultura única) e não se detetar um aumento significativo de micronúcleos, deve repetir-se o ensaio, utilizando mais células ou concentrações menos citotóxicas, conforme seja mais conveniente.

Quando se utiliza citocalasina B, devem ser utilizadas, pelo menos, 500 células por cultura para calcular o CBPI ou o índice de replicação, a fim de determinar a proliferação celular (ver o apêndice 2). Se os tratamentos forem efetuados sem citocalasina B, é essencial demonstrar que as células em cultura se dividiram como se referiu nos pontos 24 a 28.

Competência técnica do laboratório

A fim de comprovar que possui experiência suficiente na realização do ensaio antes de passar a utilizar este método em ensaios de rotina, o laboratório deve ter efetuado uma série de experiências com produtos químicos de referência positivos que ajam por diferentes mecanismos (pelo menos um com e outro sem ativação metabólica e um que aja por mecanismo aneugénico, sendo os produtos químicos correspondentes selecionados da lista constante do quadro 1), bem como várias amostras de controlo negativas (utilizando culturas não-tratadas e vários solventes/excipientes). As respostas observadas às amostras de controlo positivas e negativas devem ser coerentes com as referências bibliográficas. Este requisito não é aplicável a laboratórios com experiência, isto é, que disponham de uma base de dados históricos como se refere nos pontos 49 a 52.

O laboratório deve investigar uma seleção de produtos químicos de controlo positivo (ver o quadro 1), aplicados em tratamentos de curta e de longa duração sem ativação metabólica, bem como em tratamentos curtos com ativação metabólica, a fim de demonstrar a sua competência na deteção de produtos químicos clastogénicos e aneugénicos, determinar a eficácia do sistema de ativação metabólica e demonstrar a adequação dos métodos de contagem (análise visual ao microscópio, citometria de fluxo, citometria de varrimento por laser ou análise de imagem). A gama de concentrações dos produtos químicos selecionados deve ser escolhida de forma a proporcionar aumentos reprodutíveis e dependentes da concentração, relativamente ao nível de fundo, que permitam demonstrar a sensibilidade e a gama dinâmica do sistema de ensaio.

Dados históricos de controlo

O laboratório deve elaborar:

— um historial da gama e da distribuição dos controlos positivos;

— um historial da gama e da distribuição dos controlos negativos (amostras não-tratadas, solvente).

Ao obter os primeiros dados para um historial de distribuição dos controlos negativos, os controlos negativos realizados em paralelo devem ser coerentes com os dados de controlo negativo publicados, caso existam. À medida que se adicionarem mais dados experimentais à distribuição dos controlos, os controlos negativos realizados em paralelo devem, idealmente, situar-se dentro dos limites de 95 % dos controlos daquela distribuição (87) (88). A base de dados históricos de controlo negativo do laboratório deve ser inicialmente constituída por um mínimo de 10 experiências, embora, de preferência, deva ser constituída por, pelo menos, 20 experiências efetuadas em condições experimentais comparáveis. Os laboratórios devem utilizar métodos de controlo de qualidade, como gráficos de controlo (por exemplo: gráficos C ou gráficos de barras (88)), para identificar

▼M7

a variabilidade dos seus dados de controlo positivo e de controlo negativo e demonstrar que o laboratório domina a metodologia (83). Encontram-se na bibliografia (87) outras recomendações sobre o modo de obter e utilizar dados históricos (critérios de inclusão e exclusão de dados em séries históricas e critérios de aceitação das experiências realizadas).

As eventuais alterações ao protocolo experimental devem ser ponderadas em função da coerência dos dados com as bases de dados históricos de controlo do laboratório. As incoerências importantes que venham a verificar-se devem traduzir-se na constituição de uma nova base de dados históricos de controlo.

Os dados de controlo negativo devem ser constituídos pela incidência de células micronucleadas numa única cultura ou pela soma das incidências correspondentes a cada replicado em cultura, como descrito no ponto 28. Os controlos negativos realizados em paralelo devem, idealmente, situar-se dentro dos limites de 95 % dos controlos da distribuição da base de dados históricos de controlo negativo do laboratório (87) (88). Caso se situem fora desses limites, os dados de controlos negativos realizados em paralelo podem ser aceitáveis para inclusão no historial de distribuição de controlos se não forem valores aberrantes extremos, se o sistema de ensaio estiver comprovadamente dominado (ver o ponto 50) e se não houver indícios de erro humano ou de deficiência técnica.

DADOS E RELATÓRIOS

Apresentação dos resultados

Se se utilizar a técnica do bloqueio da citocinese, a avaliação da indução de micronúcleos deve basear-se apenas na frequência de células binucleadas que possuam micronúcleos, independentemente do número de micronúcleos por célula. A contagem do número de células com um, dois ou mais micronúcleos pode ser indicada separadamente no relatório e fornecer informações úteis, mas não é obrigatória.

Devem ser efetuadas medições em paralelo de citotoxicidade e/ou citóstase em todas as culturas tratadas e nas culturas de controlo positivo e de controlo negativo (16). Para medir o atraso do ciclo celular quando se recorre ao método do bloqueio da citocinese, calcula-se o CBPI e o índice de replicação de todas as culturas tratadas e de controlo. Se não se adicionar citocalasina B, determina-se a RPD ou o RICC — ver o apêndice 2.

Os dados devem ser fornecidos por cultura e resumidos em quadros.

Critérios de aceitabilidade

A aceitação do ensaio baseia-se nos seguintes critérios:

— Um controlo negativo realizado em paralelo é considerado aceitável para inclusão na base de dados históricos de controlo negativo do laboratório nos termos descritos no ponto 50.

— Os controlos positivos realizados em paralelo (ver o ponto 50) devem induzir respostas compatíveis com as incluídas na base de dados históricos de controlo positivo do laboratório e gerar um aumento estatisticamente significativo em relação ao controlo negativo realizado em paralelo.

— Devem respeitar-se os critérios de proliferação celular relativos ao controlo do solvente (pontos 25 a 27).

— Foram ensaiadas todas as condições experimentais, salvo se uma delas tiver dado resultados positivos (ver os pontos 36 a 40).

— É analisável um número adequado de células e de concentrações (pontos 28 e 44 a 46).

▼M7

— Os critérios de seleção da concentração máxima são coerentes com os descritos nos pontos 24 a 31.

Avaliação e interpretação dos resultados

Se se cumprirem todos os critérios de aceitabilidade, o produto químico em estudo é considerado inequivocamente positivo se, nas condições experimentais examinadas (ver os pontos 36 a 39):

— pelo menos uma das concentrações ensaiadas apresentar um aumento estatisticamente significativo em relação ao controlo negativo realizado em paralelo (89);

— esse aumento, avaliado por recurso a uma análise de tendências adequada, for dependente da dose em, pelo menos, uma das condições experimentais (ver o ponto 28);

— nenhum dos resultados estiver fora da distribuição dos dados históricos de controlo negativo (por exemplo: limites de 95 % dos controlos, com base numa distribuição de Poisson; ver o ponto 52).

Se todos estes critérios estiverem preenchidos, o produto químico em estudo é considerado passível de induzir cisões e/ou aquisições ou perdas cromossómicas neste sistema de ensaio. As referências bibliográficas (90), (91) e (92) contêm recomendações sobre os métodos estatísticos mais adequados.

Se se cumprirem todos os critérios de aceitabilidade, o produto químico em estudo é considerado inequivocamente negativo se, nas condições experimentais examinadas (ver os pontos 36 a 39):

— nenhuma das concentrações ensaiadas apresentar um aumento estatisticamente significativo em relação ao controlo negativo realizado em paralelo;

— não se observar nenhum aumento dependente da dose, numa avaliação feita com base numa análise de tendências adequada;

— todos os resultados se situarem dentro da distribuição dos dados históricos de controlo negativo (por exemplo: limites de 95 % dos controlos, com base numa distribuição de Poisson; ver o ponto 52).

Nestas circunstâncias, o produto químico em estudo é considerado não passível de induzir cisões e/ou aquisições ou perdas cromossómicas neste sistema de ensaio. As referências bibliográficas (90), (91) e (92) contêm recomendações sobre os métodos estatísticos mais adequados.

As respostas inequivocamente positivas ou inequivocamente negativas dispensam confirmação.

No caso de a resposta não ser inequivocamente positiva nem inequivocamente negativa, como se descreveu, e/ou para se tirarem conclusões sobre a importância biológica do resultado, os dados devem ser avaliados por peritos e/ou ser objeto de estudos complementares. Neste contexto, pode ser útil contar células adicionais (se isso se justificar) ou repetir o ensaio, eventualmente com alteração das condições experimentais (por exemplo: espaçamento diferente das concentrações ou outras condições de ativação metabólica, como a concentração ou origem da S9).

Em certos casos, raros, mesmo após estudos complementares, os dados obtidos não permitirão concluir por um resultado positivo ou negativo, pelo que se considerará que o resultado é ambíguo.

A indução de micronúcleos, por produtos químicos com esse efeito, nestes ensaios *in vitro* pode dever-se a cisão ou perda cromossómica ou a ambos os efeitos. Para aprofundar se o mecanismo da indução de micronúcleos se deve a atividade clastogénica e/ou a atividade aneugénica, pode recorrer-se a métodos de análise que utilizam anticorpos anticinetócoro, sondas centroméricas específicas *in situ* ou outros.

▼M7

Relatório do ensaio

Elementos a constar do relatório do ensaio:

Produto químico em estudo:

— origem, número de lote e data-limite de utilização, se conhecidos;

— estabilidade, se conhecida;

— reatividade com o solvente/excipiente ou com o meio de cultura das células;

— solubilidade e estabilidade no solvente, se conhecidas;

— medição do pH, da pressão osmótica e da quantidade de precipitado no meio de cultura ao qual foi adicionado o produto químico em estudo, consoante o caso.

Substância monocomponente:

— aspeto físico, hidrossolubilidade e outras propriedades físico-químicas relevantes;

— dados de identificação química, como as denominações IUPAC ou CAS, o número CAS, o código SMILES ou InChI, a fórmula estrutural, o grau de pureza, a identidade química das impurezas, se justificado e exequível, etc.

Substância multicomponentes, UVCB e misturas:

— caracterização, tanto quanto possível, pela identidade química (ver acima), pela ocorrência quantitativa e pelas propriedades físico-químicas relevantes dos componentes.

Solvente:

— justificação da escolha;

— percentagem no meio de cultura final.

Células:

— tipo e origem das células utilizadas;

— adequação do tipo de célula utilizado;

— ausência de micoplasmas, no caso das linhagens celulares;

— no respeitante às linhagens celulares, dados relativos à duração do ciclo celular e ao índice de proliferação;

— caso se utilizem linfócitos, sexo e idade dos dadores de sangue e quaisquer informações relevantes sobre o dador, utilização de sangue integral ou de linfócitos separados e agente mitogénico utilizado;

— duração normal (correspondente ao controlo negativo) do ciclo celular;

— no respeitante às linhagens celulares, número de repicagens (se conhecido);

— no respeitante às linhagens celulares, métodos de manutenção das culturas;

— no respeitante às linhagens celulares, número modal de cromossomas.

▼M7

Condições de realização do ensaio:

— identificação da substância bloqueante da citocinese eventualmente utilizada (por exemplo citocalasina B), concentração dessa substância e tempo de exposição das células;

— concentração do produto químico em estudo, expressa em concentração final no meio de cultura (por exemplo: μg/ml ou mg/ml de meio de cultura ou mM no meio de cultura);

— justificação da seleção das concentrações e do número de culturas, incluindo dados de citotoxicidade e limitações de solubilidade;

— composição dos meios e, quando aplicável, concentração de CO_2; teor de humidade;

— concentração (e/ou volume) do solvente e do produto químico em estudo no meio de cultura;

— tempo e temperatura de incubação;

— duração do tratamento;

— tempo decorrido entre o tratamento e a colheita das células;

— densidade celular da sementeira, se for caso disso;

— tipo e composição do sistema de ativação metabólica (fonte de S9, método de preparação da mistura de S9, concentração ou volume da mistura de S9 e de S9 no meio de cultura final, controlos de qualidade da S9 — por exemplo: atividade enzimática, esterilidade, capacidade metabólica);

— produtos químicos de controlo positivo e negativo, concentrações finais, condições e durações de tratamento, períodos de recuperação;

— métodos de preparação das lâminas e técnica de coloração utilizada;

— critérios de contagem das células micronucleadas (seleção das células examináveis e identificação dos micronúcleos);

— células analisadas (número);

— métodos de medição da citotoxicidade;

— outros dados pertinentes relativos à citotoxicidade e ao método utilizado;

— critérios definidos para que os resultados do estudo sejam considerados positivos, negativos ou ambíguos;

— método(s) de análise estatística utilizado(s);

— métodos (como a utilização de anticorpos anticinetócoro ou de sondas pancentroméricas específicas) para determinar se os micronúcleos contêm cromossomas inteiros ou fragmentos de cromossomas, se aplicável;

— métodos utilizados para determinar o pH, a pressão osmótica e a precipitação.

Resultados:

— definição das células aceitáveis para análise;

— se não se utilizar citocalasina B, número de células tratadas e número de células colhidas por cultura, caso se utilizem linhagens celulares;

▼M7

— métodos de medição da citotoxicidade utilizados (por exemplo: CBPI ou índice de replicação, caso se recorra ao método do bloqueio da citocinese, ou RICC ou RPD, no caso contrário); outros exames eventualmente realizados (por exemplo: grau de confluência celular, apoptose, necrose, contagem das células em metáfase, frequência de células binucleadas);

— sinais de precipitação e instante da determinação;

— dados de pH e de pressão osmótica do meio de tratamento, caso tenham sido determinados;

— distribuição das células mono, bi e plurinucleadas, se se utilizar um método de bloqueio da citocinese;

— número de células com micronúcleos, para cada cultura tratada e de controlo, especificando, caso se justifique, se são células binucleadas ou mononucleadas;

— relação concentração-resposta, quando for possível determiná-la;

— dados (concentrações e solventes) relativos às amostras de controlo negativo (solvente) e de controlo positivo, ensaiadas em paralelo;

— dados históricos relativos às amostras de controlo negativo (solvente) e de controlo positivo, indicando intervalos, médias e desvios-padrão e limites de 95 % dos controlos da distribuição, bem como o número de dados;

— análise estatística; valores p (probabilidade de significância), caso sejam conhecidos;

Discussão dos resultados.

Conclusões.

REFERÊNCIAS

1) OCDE (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234. OCDE, Paris.

2) Kirsch-Volders, M. (1997). Towards a validation of the micronucleus test. *Mutation Research*, vol. 392/1-2, pp. 1-4.

3) Parry, J.M., Sors, A. (1993). The detection and assessment of the aneugenic potential of environmental chemicals: the European Community aneuploidy project. *Mutation Research*, vol. 287/1, pp. 3-15.

4) Fenech, M., Morley, A.A. (1985). Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. *Cytobios*, vol. 43/172-173, pp. 233-246.

5) Kirsch-Volders, M., *et al.* (2000). Report from the *In Vitro* Micronucleus Assay Working Group. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, vol. 35/3, pp. 167-172.

6) Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, vol. 2/5, pp. 1084-1104.

7) Fenech, M., Morley, A.A. (1986). Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of *in-vivo* ageing and low dose X-irradiation. *Mutation Research*, vol. 161/2, pp. 193-198.

8) Eastmond, D.A., Tucker, J.D. (1989). Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, vol. 13/1, pp. 34-43.

▼**M7**

9) Eastmond, D.A., Pinkel, D. (1990). Detection of aneuploidy and aneuploidy-inducing agents in human lymphocytes using fluorescence *in--situ* hybridisation with chromosome-specific DNA probe. *Mutation Research*, vol. 234/5, pp. 9-20.

10) Miller, B.M., *et al.* (1991). Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to *in situ* hybridization with biotinylated gamma satellite DNA. *Mutagenesis*, vol. 6/4, pp. 297-302.

11) Farooqi, Z., Darroudi, F., Natarajan, A.T. (1993). The use of fluorescence *in--situ* hybridisation for the detection of aneugens in cytokinesis-blocked mouse splenocytes. *Mutagenesis*, vol. 8/4, pp. 329-334.

12) Migliore, L., *et al.* (1993). Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence *in situ* hybridization with a centromeric probe. *Mutation Research*, vol. 319/3, pp. 205-213.

13) Norppa, H., Renzi, L., Lindholm, C. (1993). Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis-blocked human lymphocytes by antikinetochore staining and *in situ* hybridization. *Mutagenesis*, vol. 8/6, pp. 519-525.

14) Eastmond, D.A, Rupa, D.S., Hasegawa, L.S. (1994). Detection of hyperdiploidy and chromosome breakage in interphase human lymphocytes following exposure to the benzene metabolite hydroquinone using multicolor fluorescence *in situ* hybridization with DNA probes. *Mutation Research*, vol. 322/1, pp. 9-20.

15) Marshall, R.R., *et al.* (1996). Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) with chromosome-specific centromeric probes: a sensitive method to detect aneuploidy. *Mutation Research*, vol. 372/2, pp. 233-245.

16) Zijno, P., *et al.* (1996). Analysis of chromosome segregation by means of fluorescence *in situ* hybridization: application to cytokinesis-blocked human lymphocytes. *Mutation Research*, vol. 372/2, 211-219.

17) Kirsch-Volders *et al.* (2003). Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Mutation Research*, vol. 540/2, pp. 153-163.

18) Capítulo B.10 deste anexo: Ensaio *in vitro* de aberrações cromossómicas em mamíferos.

19) Lorge, E., *et al.* (2006). SFTG International collaborative Study on *in vitro* micronucleus test. I. General conditions and overall conclusions of the study. *Mutation Research*, vol. 607/1, pp. 13-36.

20) Clare, G., *et al.* (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test. II. Using human lymphocytes. *Mutation Research*, vol. 607/1, pp. 37-60.

21) Aardema, M.J., *et al.* (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test. III. Using CHO cells. *Mutation Research*, vol. 607/1, pp. 61-87.

22) Wakata, A., *et al.* (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test. IV. Using CHO/IU cells. *Mutation Research*, vol. 607/1, pp. 88-124.

23) Oliver, J., *et al.* (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test. V. Using L5178Y cells. *Mutation Research*, vol. 607/1, pp. 125-152.

24) Albertini, S., *et al.* (1997). Detailed data on *in vitro* MNT and *in vitro* CA: industrial experience. *Mutation Research*, vol. 392/1-2, pp. 187-208.

25) Miller, B. *et al.* (1997). Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the *in vitro* chromosome aberration test: industrial experience. *Mutation Research*, vol. 392/1-2, pp. 45-59.

▼M7

26) Miller, B., *et al.* (1998). Evaluation of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosomal aberration assay: position of the GUM Working Group on the *in vitro* micronucleus test. Gesellschaft fur Umwelt-Mutations-forschung. *Mutation Research*, vol. 410, pp. 81-116.

27) Kalweit, S., *et al.* (1999). Chemically induced micronucleus formation in V79 cells — comparison of three different test approaches. *Mutation Research*, vol. 439/2, pp. 183-190.

28) Kersten, B., *et al.* (1999). The application of the micronucleus test in Chinese hamster V79 cells to detect drug-induced photogenotoxicity. *Mutation Research*, vol. 445/1, pp. 55-71.

29) von der Hude, W., *et al.* (2000). *In vitro* micronucleus assay with Chinese hamster V79 cells — results of a collaborative study with *in situ* exposure to 26 chemical substances. *Mutation Research*, vol. 468/2, pp. 137-163.

30) Garriott, M.L., Phelps, J.B., Hoffman, W.P. (2002). A protocol for the *in vitro* micronucleus test, I. Contributions to the development of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 16 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. *Mutation Research*, vol. 517/1-2, pp. 123-134.

31) Matsushima, T., *et al.* (1999). Validation study of the *in vitro* micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU). *Mutagenesis*, vol. 14/6, pp. 569-580.

32) Elhajouji, A., Lorge, E. (2006). Special Issue: SFTG International collaborative study on *in vitro* micronucleus test. *Mutation Research*, vol. 607/1, pp. 1-152.

33) Kirkland, D. (2010). Evaluation of different cytotoxic and cytostatic measures for the *in vitro*micronucleus test (MNVit): Introduction to the collaborative trial. *Mutation Research*, vol. 702/2, pp. 139-147.

34) Hashimoto K., *et al.* (2011). Comparison of four different treatment conditions of extended exposure in the *in vitro* micronucleus assay using TK6 lymphoblastoid cells. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, vol. 59/1, pp. 28-36.

35) Honma, M., Hayashi, M. (2011). Comparison of *in vitro* micronucleus and gene mutation assay results for p53-competent versus p53-deficient human lymphoblastoid cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, vol. 52/5, pp. 373-384.

36) Zhang, L.S., et al. (1995). A comparative study of TK6 human lymphoblastoid and L5178Y mouse lymphoma cell lines in the in vitro micronucleus test. Mutation Research Letters, vol. 347/3-4, pp. 105-115.

37) ECVAM (2006). Statement by the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) Scientific Advisory Committee (ESAC) on the scientific validity of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosome aberration assay for genotoxicity testing. 25.ª reunião do ESAC, 16-17 de novembro de 2006. Disponível em: http://ecvam.jrc.it/index.htm.

38) ESAC (2006). ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) Peer Review, Retrospective Validation of the *In Vitro* Micronucleus Test, Summary and Conclusions of the Peer Review Panel. Disponível em: http://ecvam.jrc.it/index.htm.

39) Corvi, R., *et al.* (2008). ECVAM Retrospective Validation of *in vitro* Micronucleus Test (MNT). *Mutagenesis*, vol. 23/4, pp. 271-283.

40) ILSI (artigo em projeto). Lorge, E., Moore, M.M., Clements, J., O'Donovan, M., Honma, M., Kohara, A., van Benthem, J., Galloway, S., Armstrong, M.J., Sutter, A., Thybaud, V., Gollapudi, B., Aardema, M., Young-Tannir, J. Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. *Mutation Research.*

▼M7

41) Scott, D., *et al.* (1991). International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens, Genotoxicity under extreme culture conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. *Mutation Research*, vol. 257/2, pp. 147-205.

42) Morita, T., *et al.* (1992). Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells. *Mutation Research*, vol. 268/2, pp. 297-305.

43) Brusick, D. (1986). Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations. *Environmental Mutagenesis*, vol. 8/6, pp. 789-886.

44) Long, L.H., *et al.* (2007). Different cytotoxic and clastogenic effects of epigallocatechin gallate in various cell-culture media due to variable rates of its oxidation in the culture medium. *Mutation Research*, vol. 634/1-2, pp. 177-183.

45) Nesslany, F., *et al.* (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. *Environmental and Molecular Mutation.*, vol. 49, pp. 439--452.

46) Fenech, M., Morley, A.A. (1985). Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research*, vol. 147/1-2, pp. 29-36.

47) Fenech, M. (1997). The advantages and disadvantages of cytokinesis-blood micronucleus method. *Mutation Research*, vol. 392, pp. 11-18.

48) Payne, C.M., *et al* (2010). Hydrophobic bile acid-induced micronuclei formation, mitotic perturbations, and decreases in spindle checkpoint proteins: relevance to genomic instability in colon carcinogenesis. *Nutrition and Cancer*, vol. 62/6, pp. 825-840.

49) Bazin, E., *et al.* (2010). Genotoxicity of a Freshwater Cyanotoxin, Cylindrospermopsin, in Two Human Cell Lines: Caco-2 and HepaRG. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, vol. 51/3, pp. 251-259.

50) Le Hegarat, L., *et al.* (2010). Assessment of the genotoxic potential of indirect chemical mutagens in HepaRG cellsby the comet and the cytokinesis-block micronucleus assays. *Mutagenesis*, vol. 25/6, pp. 555-560.

51) Josse, R., *et al.* (2012). An adaptation of the human HepaRG cells to the *in vitro* micronucleus assay. *Mutagenesis*, vol. 27/3, pp. 295-304.

52) Ehrlich, V., *et al.* (2002). Fumonisin B_1 is genotoxic in human derived hepatoma (HepG2) cells. *Mutagenesis*, vol. 17/3, pp. 257-260.

53) Knasmüller, S., *et al.* (2004). Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge. *Toxicology*, vol. 198/1-3, pp. 315-328.

54) Gibson, D.P., *et al.* (1997). Induction of micronuclei in Syrian hamster embryo cells: comparison to results in the SHE cell transformation assay for National Toxicology Program test chemicals. *Mutation Research*, vol. 392/1-2, pp. 61-70.

55) Bonassi, S., *et al.* (2001). HUman MicroNucleus Project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes. I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria and host factors on the frequency of micronuclei. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, vol. 37/1, pp. 31-45.37

56) Maron, D.M., Ames, B.N. (1983). Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research*, vol. 113/3-4, pp. 173-215.

57) Ong, T.-m., *et al.* (1980). Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver. *Journal of Environmental Pathology and Toxicology*, vol. 4/1, pp. 55-65.

▼M7

58) Elliott, B.M., *et al.* (1992). Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in--vitro* genotoxicity assays. *Mutagenesis*, vol. 7, pp. 175-177.

59) Matsushima, T., *et al.* (1976). «A safe substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems» *in In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing. de Serres, F.J., *et al.*. (editores), Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

60) Johnson, T.E., Umbenhauer, D.R., Galloway, S.M. (1996). Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, vol. 28, pp. 51-59.

61) PNUA (2001). Convenção de Estocolmo sobre Poluentes Orgânicos Persistentes. Programa das Nações Unidas para o Ambiente (PNUA). Disponível em: http://www.pops.int/

62) Tucker, J.D., Christensen, M.L. (1987). Effects of anticoagulants upon sister-chromatid exchanges, cell-cycle kinetics, and mitotic index in human peripheral lymphocytes. *Mutation Research*, vol.190/3, pp. 225-8.

63) Krahn, D.F., Barsky, F.C., McCooey, K.T. (1982). «CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids» *in* Genotoxic Effects of Airborne Agents. Tice, R.R., Costa, D.L., Schaich, K.M. (editores). Plenum, Nova Iorque, pp. 91-103.

64) Zamora, P.O., *et al.* (1983). Evaluation of an exposure system using cells grown on collagen gels for detecting highly volatile mutagens in the CHO/HGPRT mutation assay. *Environmental Mutagenesis*, vol. 5/6, pp. 795-801.

65) Asakura, M., *et al.* (2008). An improved system for exposure of cultured mammalian cells to gaseous compounds in the chromosomal aberration assay. *Mutation Research*, vol. 652/2, pp. 122-130.

66) Fenech, M. (1993). The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutation Research*, vol. 285/1, pp. 35-44.

67) Phelps, J.B., Garriott, M.L., Hoffman, W.P. (2002). A protocol for the *in vitro* micronucleus test. II. Contributions to the validation of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 10 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. *Mutation Research*, vol. 521/1-2, pp. 103-112.

68) Kirsch-Volders, M., *et al.* (2004). Corrigendum to «Report from the *in vitro* micronucleus assay working group» *Mutation Research*, 564, 97-100.

69) Lorge, E., *et al.* (2008). Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. I. Theoretical aspects. *Mutation Research*, vol. 655/1-2, pp. 1-3.

70) Surralles, J., *et al.* (1995). Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research*, vol. 341/3, pp. 169-184.

71) Honma, M. (2011). Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test. *Mutation Research*, vol. 724, pp. 86-87.

72) Pfuhler, S., *et al.* (2011). *In vitro* genotoxicity test approaches with better predictivity: Summary of an IWGT workshop. *Mutation Research*, vol. 723/2, pp. 101-107.

73) OCDE (2014). Document supporting the WNT decision to implement revised criteria for the selection of the top concentration in the *in vitro* mammalian cell assays on genotoxicity (Test Guidelines 473, 476 and 487). ENV/JM/TG(2014)17. Disponível mediante pedido.

▼M7

74) Morita T., Honma, M., Morikawa, K. (2012). Effect of reducing the top concentration used in the *in vitro* chromosomal aberration test in CHL cells on the evaluation of industrial chemical genotoxicity. *Mutation Research*, vol. 741, pp. 32-56.

75) Brookmire L., Chen, J.J., Levy, D.D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *in vitro* Chromosome Aberrations Assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, vol. 54/1, pp. 36-43.

76) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention (2011). Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances. http://www.epa.gov/opptintr/newchems/pubs/uvcb.txt.

77) Sobol, Z., *et al.* (2012). Development and validation of an *in vitro* micronucleus assay platform in TK6 cells. *Mutation Research*, vol. 746/1, pp. 29-34.

78) Hayashi, M., Sofuni, T., Ishidate, M., Jr. (1983). An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test. *Mutation Research*, vol. 120/4, pp. 241-247.

79) MacGregor, J.T., Wehr, C.M., Langlois, R.G. (1983). A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y. *Mutation Research*, vol. 120/4, pp. 269-275.

80) Bryce, S.M., *et al.* (2011). Miniaturized flow cytometry-based CHO-K1 micronucleus assay discriminates aneugenic and clastogenic modes of action. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, vol. 52/4, pp. 280–286.

81) Nicolette, J., *et al.* (2011). *In vitro* micronucleus screening of pharmaceutical candidates by flow cytometry in Chinese hamster V79 cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, vol. 52/5, pp. 355-362.

82) Shi, J., Bezabhie, R., Szkudlinska, A. (2010). Further evaluation of a flow cytometric *in vitro* micronucleus assay in CHO-K1 cells: a reliable platform that detects micronuclei and discriminates apoptotic bodies. *Mutagenesis*, vol. 25/1, pp. 33-40.

83) OCDE (2014). Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines. OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS). Series on Testing and Assessment, No. 198. OECD Publishing, Paris.

84) Fenech, M., *et al.* (2003). HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research*, vol. 534/1-2, pp. 65-75.

85) Elhajouji, A., Cunha, M., Kirsch-Volders, M. (1998). Spindle poisons can induce polyploidy by mitotic slippage and micronucleate mononucleates in the cytokinesis-block assay. *Mutagenesis*, vol. 13/2, pp. 193-8.

86) Kirsch-Volders, M., *et al.* (2011). The *in vitro* MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. *Archives of Toxicology*, vol. 85/8, pp. 873-99.

87) Hayashi, M., *et al.* (2010). Compilation and use of genetic toxicity historical control Data. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, vol. 723/2, pp. 87-90.

88) Ryan, T. P. (2000). *Statistical Methods for Quality Improvement*. 2.ª edição. John Wiley and Sons, Nova Iorque.

89) Hoffman, W.P., Garriott, M.L., Lee, C. (2003). «*In vitro* micronucleus test» *in Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics*. 2.ª edição. Chow, S. (editores), Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, pp. 463-467.

90) Fleiss, J.L., Levin, B., Paik, M.C. (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions. 3.ª edição. John Wiley & Sons, Nova Iorque.

91) Galloway, S.M., *et al.* (1987). Chromosome aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, vol. 10/suppl. 10, pp. 1-175.

▼**M7**

92) Richardson, C., *et al.* (1989). Analysis of Data from *in vitro* Cytogenetic Assays, *in* Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. Kirkland, D.J. (editores), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.

93) International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use.

▼M7

Apêndice 1

DEFINIÇÕES

Aneugénio: Produto químico ou processo que, por interação com os componentes do aparelho do ciclo mitótico ou meiótico de divisão celular, origina aneuploidia em células ou organismos.

Aneuploidia: Desvio, num único ou em mais cromossomas, mas não por séries completas de cromossomas (poliploidia), do número diploide (ou haploide) normal de cromossomas.

Apoptose: Morte celular programada, caracterizada por uma série de etapas conducentes à desintegração das células em partículas envolvidas por membranas, que são em seguida eliminadas por fagocitose ou excreção.

Proliferação celular: Aumento do número de células por divisão celular mitótica.

Centrómero: Região do ADN de um cromossoma na qual os dois cromatídeos se juntam e à qual os dois cinetócoros estão ligados lado a lado.

Produto químico: Substância ou mistura.

Concentrações: Trata-se das concentrações finais do produto químico no meio de cultura.

Clastogénio: Produto químico ou ocorrência que causa aberrações cromossómicas estruturais em populações celulares ou organismos eucarióticos.

Citocinese: Processo de divisão celular imediatamente após a mitose, conducente à formação de duas células-filhas, cada uma com o seu núcleo.

Índice de proliferação com citocinese bloqueada (em inglês «CBPI», de «*cytokinesis-block proliferation index*»): Proporção de células «segunda divisão» na população tratada, relativamente à amostra de controlo não-tratada (ver a fórmula no apêndice 2).

Citóstase: Inibição do crescimento celular (ver a fórmula no apêndice 2).

Citotoxicidade: No respeitante aos ensaios abrangidos pelo presente método de ensaio e realizados com citocalasina B, define-se «citotoxicidade» como uma redução do índice de proliferação com bloqueio da citocinese (CBPI) ou do índice de replicação (IR) das células tratadas, relativamente à amostra de controlo negativo (ver o ponto 26 e o apêndice 2).

No respeitante aos ensaios abrangidos pelo presente método de ensaio e realizados sem citocalasina B, define-se «citotoxicidade» como uma redução da duplicação da população em termos relativos (RPD) ou do aumento relativo da contagem celular (RICC) das células tratadas, relativamente à amostra de controlo negativo (ver o ponto 27 e o apêndice 2).

Genotóxico: Termo geral que abrange todos os tipos de danos no ADN ou nos cromossomas, incluindo fraturas, supressão de segmentos, aduções, ligações e alterações nucleotídicas, rearranjos, mutações génicas, aberrações cromossómicas e aneuploidia. Nem todos os tipos de efeitos genotóxicos originam mutações ou danos cromossómicos estáveis.

Célula em interfase: Célula que não está na fase mitótica.

Cinetócoro: Estrutura proteica formada no centrómero de um cromossoma, à qual se ligam as fibras fusiformes durante a divisão celular, permitindo o movimento organizado dos cromossomas-filhos para os polos das células-filhas.

▼M7

Micronúcleo: Pequeno núcleo separado do núcleo principal da célula e que se adiciona a este, formado durante a telófase da mitose ou meiose por cromossomas inteiros ou fragmentos de cromossoma retardatários.

Mitose: Divisão do núcleo celular, habitualmente subdividida em prófase, prometáfase, metáfase, anáfase e telófase.

Índice mitótico: Relação entre o número de células em metáfase e o número total de células observadas numa população de células; fornece uma indicação do grau de proliferação da população em causa.

Mutagénico: Que produz uma alteração hereditária de sequências de pares de bases do ADN em genes ou da estrutura dos cromossomas (aberrações cromossómicas).

Não-disjunção: Falha de separação de cromatídeos emparelhados, que não são adequadamente segregados para as células-filhas em formação, originando células-filhas com número anormal de cromossomas.

Estado p53: A proteína p53 participa na regulação do ciclo celular, na apoptose e na reparação do ADN. As células com défice de proteína p53 funcional, incapazes de suspender o ciclo celular ou de eliminar as células danificadas por apoptose ou por outros mecanismos (como a indução de reparação do ADN) relacionados com as funções da p53 em resposta a danos no ADN, devem, em teoria, ser mais atreitas a mutações genéticas ou a aberrações cromossómicas.

Poliploidia: Aberrações cromossómicas numéricas em células ou organismos, que abrangem uma ou mais séries completas de cromossomas — por oposição à aneuploidia, que abrange um ou mais cromossomas.

Índice de proliferação (IP): Método de medição da citotoxicidade quando não se utiliza citocalasina B (ver a fórmula no apêndice 2).

Aumento relativo da contagem celular (em inglês «RICC», de «*relative increase in cell count*»): Método de medição da citotoxicidade quando não se utiliza citocalasina B (ver a fórmula no apêndice 2).

Duplicação da população em termos relativos (em inglês «RPD», de «*relative population doubling*»): Método de medição da citotoxicidade quando não se utiliza citocalasina B (ver a fórmula no apêndice 2).

Índice de replicação (IR): Razão entre o número de ciclos de divisão celular completados numa cultura tratada e na amostra de controlo não-tratada, durante o período de exposição e de recuperação (ver a fórmula no apêndice 2).

Fração S9 de fígado: Sobrenadante após centrifugação do homogeneizado de fígado a 9000 g (extrato de fígado em bruto).

Mistura S9: Mistura de fração S9 de fígado e cofatores necessários à atividade enzimática metabólica.

Amostra de controlo do solvente: Termo geral que define as culturas de controlo tratadas apenas com o solvente utilizado para dissolver o produto químico em estudo.

Produto químico em estudo: Qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado este método de ensaio.

Amostra de controlo não-tratada: Cultura não sujeita a qualquer tratamento (com um produto químico em estudo ou solvente), mas processada simultaneamente e do mesmo modo que as culturas tratadas com o produto químico em estudo.

▼M7

Apêndice 2

FÓRMULAS DE QUANTIFICAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

Caso se utilize citocalasina B, a citotoxicidade é avaliada com base no **índice de proliferação com citocinese bloqueada (CBPI)** ou no **índice de replicação (IR)** (17) (69). O primeiro indica o número médio de núcleos por célula, podendo ser utilizado para calcular a proliferação celular. O índice de replicação indica a relação entre o número de ciclos celulares por célula durante o período de exposição à citocalasina B nas culturas tratadas e nas culturas de controlo, podendo ser utilizado para calcular a percentagem de citóstase:

$$\text{Percentagem de citóstase} = 100 - 100\{(\text{CBPI}_T - 1) \div (\text{CBPI}_C - 1)\}$$

em que:

T = se refere à cultura tratada com o produto químico em estudo,

C = se refere às culturas de controlo

e:

$$\text{CBPI} = \frac{((\text{n.}^{o}\text{de células mononucleadas}) + (2 \times \text{n.}^{o}\text{de células binucleadas}) + (3 \times \text{n.}^{o}\text{de células plurinucleadas}))}{(\text{número total de células})}$$

Por conseguinte, se o CBPI for igual a 1 (todas as células mononucleadas), a citóstase é de 100 %.

Citóstase = 100-IR

$$\text{IR} = \frac{((\text{n.}^{o}\text{de células binucleadas}) + (2 \times \text{n.}^{o}\text{de células plurinucleadas}))/(\text{n.}^{o}\text{total de células})_T}{((\text{n.}^{o}\text{de células binucleadas}) + (2 \times \text{n.}^{o}\text{de células plurinucleadas}))/(\text{n.}^{o}\text{total de células})_C} \times 100$$

T = culturas tratadas,

C = culturas de controlo.

Por conseguinte, se o IR for de 53 %, em termos numéricos apenas 53 % das células que se dividiram para formar células binucleadas e plurinucleadas na cultura de controlo se dividiram na cultura tratada — o que corresponde a 47 % de citóstase.

Caso não se utilize citocalasina B, recomenda-se a avaliação da citotoxicidade com base no **aumento relativo da contagem celular (RICC)** ou na **duplicação da população em termos relativos (RPD)** (69), pois ambos os parâmetros têm em conta a proporção das células que sofreram divisão na população celular.

$$\textbf{RICC}(\%) = \frac{(\text{Aumento do número de células nas culturas tratadas}(\text{final} - \text{inicial}))}{(\text{Aumento do número de células nas culturas de controlo}(\text{final} - \text{inicial}))} \times 100$$

$$\textbf{RPD}(\%) = \frac{(\text{Número de duplicações de população nas culturas tratadas})}{(\text{Número de duplicações de população nas culturas de controlo})} \times 100$$

em que:

Duplicação da população = [log (n.º de células após tratamento ÷ n.º inicial de células)] ÷ log 2

A um RICC ou RPD de 53 % corresponde, pois, uma citotoxicidade/citóstase de 47 %.

▼**M7**

Mediante o **índice de proliferação (IP)**, pode quantificar-se a citotoxicidade por contagem do número de clones constituídos por 1 célula (cl1), 2 células (cl2), 3 a 4 células (cl4) e 5 a 8 células (cl8):

$$IP = \frac{((1 \times cl1) + (2 \times cl2) + (3 \times cl4) + (4 \times cl8))}{(cl1 + cl2 + cl4 + cl8)}$$

O índice de proliferação tem sido utilizado como parâmetro fiável e efetivo de citotoxicidade também para linhagens celulares cultivadas *in vitro* sem citocalasina B (35) (36) (37) (38), podendo ser encarado como parâmetro adicional útil.

Em qualquer caso, o número de células antes do tratamento deve ser igual nas culturas tratadas e nas culturas de controlo negativo.

Embora o RCC (isto é, número de células nas culturas tratadas/número de células nas culturas de controlo) tenha sido utilizado como parâmetro de citotoxicidade, deixou de ser recomendado, uma vez que pode subestimar a citotoxicidade.

Quando se utilizam sistemas de contagem automáticos (por exemplo citometria de fluxo, citometria de varrimento por laser ou análise de imagem), pode substituir-se na fórmula o número de células pelo número de núcleos.

Nas culturas de controlo negativo, a duplicação da população e o índice de replicação devem ser compatíveis com a exigência de que a colheita de células após o tratamento ocorra no termo de um período equivalente a cerca de 1,5 a 2,0 vezes a duração normal do ciclo celular.

▼M3

B.50. SENSIBILIZAÇÃO CUTÂNEA: ENSAIO DE GÂNGLIOS LINFÁTICOS LOCAIS: DA

INTRODUÇÃO

1. As Diretrizes da OCDE para o ensaio de produtos químicos (*OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*) e os métodos de ensaio da UE são revistos periodicamente à luz do progresso científico, das necessidades normativas em evolução e de considerações de bem-estar animal. O primeiro método de ensaio utilizado para determinar a sensibilização cutânea no rato – o ensaio de gânglios linfáticos locais (método LLNA, «*Local Lymph Node Assay*», *Test Guideline* 429 da OCDE, capítulo B.42 deste anexo) foi revisto (1). Foram publicados em (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) elementos pormenorizados sobre a validação do método LLNA, bem como uma revisão dos trabalhos conexos. No método LLNA utiliza-se iodo radioativo ou timidina radioativa para medir a proliferação de linfócitos, pelo que o recurso a este ensaio está limitado sempre que a aquisição, utilização e eliminação de matérias radioativas seja problemática. O método «LLNA: DA» (desenvolvido pela Daicel Chemical Industries, Ltd.) é uma versão modificada do método LLNA: não utiliza matérias radioativas e permite determinar quantitativamente, por bioluminescência, o teor de trifosfato de adenosina (ATP) como indicador da proliferação de linfócitos. O método foi validado e examinado, tendo sido recomendado por um painel de avaliação internacional constituído por peritos devido à sua utilidade para a identificação de produtos químicos sensibilizantes e não sensibilizantes da pele, com algumas limitações (10) (11) (12) (13). O método foi concebido para avaliar o potencial de sensibilização da pele de animais por produtos químicos (substâncias e misturas). O capítulo B.6 deste anexo e o *Test Guideline* 406 da OCDE recorrem a ensaios em cobaias, nomeadamente o ensaio de maximização na cobaia e o ensaio de Buehler (14). O método LLNA (capítulo B.42 deste anexo, *Test Guideline* 429 da OCDE) e as duas alterações do mesmo que não recorrem a matérias radioativas (LLNA: DA – capítulo B.50 deste anexo, *Test Guideline* 442 A da OCDE – e LLNA: BrdU-ELISA – capítulo B.51 deste anexo, *Test Guideline* 442 B da OCDE) apresentam vantagens em relação aos ensaios na cobaia descritos no capítulo B.6 e no *Test Guideline* 406 da OCDE (14), traduzidas na redução e no aperfeiçoamento do recurso a animais.

2. O método LLNA: DA é similar ao método LLNA. Estuda a fase indutora da sensibilização cutânea e fornece dados quantitativos adequados para a avaliação da resposta à dosagem. Por outro lado, o facto de permitir detetar sensibilizantes cutâneos sem necessidade de utilizar marcadores radioativos do ADN elimina as questões potenciais em matéria de exposição profissional à radioatividade e de eliminação de resíduos. O presente método possibilita a utilização crescente de ratos na deteção de sensibilizantes cutâneos, o que facilita a redução do recurso a cobaias em ensaios de potencial de sensibilização cutânea (método B6, *Test Guideline* 406 da OCDE) (14).

DEFINIÇÕES

3. As definições utilizadas figuram no apêndice 1.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES

4. O método LLNA: DA é um método LLNA modificado para a identificação de produtos químicos potencialmente sensibilizantes da pele, com determinadas limitações. Isso não implica, necessariamente, que o método LLNA: DA deva ser sempre utilizado em substituição do método LLNA ou de ensaios em cobaias (método B.6, *Test Guideline* 406 da OCDE) (14), mas apenas que é equivalente aos segundos e pode ser utilizado em alternativa, gerando normalmente resultados positivos ou negativos que dispensam confirmação (10) (11). Antes de efetuar o estudo, o laboratório deve examinar todas as informações disponíveis sobre a substância em causa, nomeadamente a identificação e a estrutura química, as propriedades físico-químicas,

▼M3

os resultados de quaisquer outros ensaios de toxicidade *in vitro* ou *in vivo* da substância e dados toxicológicos sobre produtos químicos com estrutura semelhante. Esse exame destina-se a determinar se o método LLNA: DA se adequa à substância em estudo (dada a incompatibilidade de alguns tipos de produtos químicos com o método LLNA: DA – ver o ponto 5), bem como a facilitar a escolha das dosagens.

5. O método LLNA: DA é um método *in vivo*, não eliminando, portanto, a utilização de animais na avaliação da atividade sensibilizante alérgica por contacto. Pode, no entanto, reduzir o recurso a animais para estes fins, quando comparado com os ensaios na cobaia (método B.6 e *Test Guideline* 406 da OCDE) (14). Além disso, proporciona melhorias substanciais (menos dor e sofrimento) no modo como os animais são utilizados nos ensaios de sensibilização alérgica por contacto, uma vez que, ao contrário do método B.6 e do *Test Guideline* 406 da OCDE, não exige a indução de reações de hipersensibilidade dérmica por agentes externos. Apesar das vantagens do método LLNA: DA em relação ao método B.6 e ao *Test Guideline* 406 da OCDE (14), existem limitações que podem exigir o recurso a estes últimos, por exemplo, para ensaiar determinados metais, em virtude dos resultados falsos positivos que se obtêm com certos irritantes cutâneos (como algumas substâncias tensioativas) (6) – 1 e capítulo B.42 do presente anexo – ou devido a problemas de solubilidade da substância em estudo. Por outro lado, no caso das substâncias ou classes de substâncias químicas com grupos funcionais que, comprovadamente, suscitem dúvidas (16), pode ser necessário recorrer a ensaios em cobaias – método B.6, *Test Guideline* 406 da OCDE (14). Relativamente ao método LLNA: DA, foi recomendado que se ponderem também as limitações identificadas para o método LLNA (1 e capítulo B.42 do presente anexo) (10). Acresce que o método LLNA: DA pode não ser adequado para ensaiar substâncias que afetem os níveis de ATP (por exemplo, substâncias inibidoras do ATP) ou que afetem a exatidão da medição do ATP intracelular (por exemplo, presença de enzimas que degradem o ATP ou de ATP extracelular no gânglio linfático). Salvaguardadas estas limitações, o método LLNA: DA é potencialmente aplicável ao ensaio de qualquer substância, a menos que esta possua alguma propriedade passível de comprometer a exatidão do método. Deve ainda ser ponderada a possibilidade de obtenção de resultados positivos próximos do limite caso os valores de índice de estimulação (IE) estejam compreendidos entre 1,8 e 2,5 (ver os pontos 31 e 32). Estas reticências baseiam-se nos dados de validação de 44 substâncias com índice de estimulação igual ou superior a 1,8 (ver o ponto 6), nas quais o método LLNA: DA identificou corretamente todas as 32 substâncias classificadas de sensibilizantes pelo método LLNA, mas identificou incorretamente três das 12 substâncias com índice de estimulação compreendido entre 1,8 e 2,5 (resultado positivo próximo do limite) classificadas de não sensibilizantes pelo método LLNA (10). Todavia, como se utilizou o mesmo conjunto de dados para fixar os valores de índice de estimulação e calcular as propriedades de previsão do ensaio, os resultados referidos podem traduzir uma sobrestimação das reais propriedades de previsão do método.

PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

6. O princípio básico subjacente ao método LLNA: DA é que os sensibilizantes induzem uma proliferação de linfócitos nos gânglios linfáticos drenantes do local de aplicação da substância em estudo. Esta proliferação é proporcional à dosagem e à potência do alergénio aplicado e constitui um modo simples de obter uma medida quantitativa da sensibilização. Mede-se a proliferação e compara-se a proliferação média em cada grupo estudado com a proliferação média no grupo de controlo tratado com o excipiente. Determina-se a razão entre a proliferação média em cada grupo tratado e a proliferação observada em paralelo no grupo de controlo tratado com o excipiente; essa razão é denominada índice de estimulação (IE). Para que uma substância em estudo

▼M3

possa ser classificada de sensibilizante cutânea potencial, este índice deve ser ≥ 1,8. O presente método baseia-se na medição do teor de ATP por bioluminescência (reconhecidamente correlacionado com o número de células vivas) (17) como indicador do aumento do número de células em proliferação nos gânglios linfáticos drenantes do sistema auricular (18) (19). O método de bioluminescência utiliza a enzima luciferase para catalisar a emissão de luz a partir de ATP e luciferina, de acordo com a seguinte reação:

$$ATP + luciferina + O_2 \xrightarrow{Luciferase} oxiluciferina + AMP + PP_i + CO_2 + luz$$

A intensidade da luz emitida é medida com um luminómetro e é diretamente proporcional à concentração de ATP. O ensaio luciferina-luciferase é um método sensível de determinação quantitativa do ATP utilizado numa grande variedade de aplicações (20).

DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

Escolha da espécie animal

7. O rato é a espécie escolhida para este ensaio. Os estudos de validação do método LLNA: DA foram efetuados exclusivamente com a estirpe CBA/J, que é portanto considerada a estirpe preferida (12) (13). Utilizam-se fêmeas adultas jovens, nulíparas e não grávidas. No início do estudo, os animais devem ter entre oito e 12 semanas; a variação de peso dos animais entre si deve ser mínima e não deve exceder 20 % do peso médio dos mesmos. Podem ser utilizadas outras estirpes, bem como machos, quando houver dados suficientes que demonstrem não existirem diferenças significativas na resposta ao método LLNA: DA relacionadas com a estirpe e/ou o sexo do animal.

Condições de alojamento e alimentação

8. Os ratos devem ser alojados em grupo (21), a menos que se justifique cientificamente o seu alojamento individual. A temperatura do biotério deve ser de 22 °C ± 3 °C. A humidade relativa não deve ser inferior a 30 % e, de preferência, não deve exceder 70 %, exceto durante a limpeza do biotério. Idealmente, deve procurar manter-se entre 50 % e 60 %. A iluminação deve ser artificial, com uma sequência de 12 horas de luz seguidas de 12 horas de escuridão. Na alimentação, podem utilizar-se dietas convencionais de laboratório e deve ser fornecida água de beber sem restrições.

Preparação dos animais

9. Os animais são selecionados aleatoriamente, marcados de modo a permitir a identificação individual (mas não por marcação nas orelhas) e mantidos em gaiolas durante, pelo menos, cinco dias antes da aplicação das doses, para permitir a aclimatação às condições do laboratório. Antes do início do tratamento, examinam-se os animais, de modo a assegurar que não apresentam lesões cutâneas visíveis.

Preparação das soluções a aplicar

10. Antes da aplicação nas orelhas dos ratos, os produtos químicos sólidos dissolvem-se ou suspendem-se em solventes/excipientes e, se necessário, diluem-se. Os produtos líquidos podem ser aplicados tal e qual ou ser diluídos antes da aplicação. Os produtos químicos insolúveis, como os geralmente presentes nos dispositivos médicos, devem ser sujeitos a um processo de extração exaustivo com um solvente apropriado, a fim de nele concentrar para o ensaio todos os componentes extraíveis, antes da aplicação nas orelhas dos ratos. As substâncias em estudo devem ser preparadas diariamente, a menos que haja dados de estabilidade que demonstrem ser aceitável o seu armazenamento.

▼M3

Verificação da fiabilidade

11. Utilizam-se produtos químicos de controlo positivo para demonstrar o desempenho adequado do ensaio, devendo obter-se uma resposta quantitativamente bem caracterizada, com sensibilidade adequada e reprodutível, a essas substâncias sensibilizantes. Recomenda-se a inclusão, em paralelo, de um produto químico de controlo positivo, para demonstrar a competência do laboratório na execução de cada ensaio e possibilitar a avaliação da reprodutibilidade e comparabilidade intra e interlaboratoriais. Algumas autoridades reguladoras exigem também um produto químico de controlo positivo em cada estudo, pelo que os laboratórios devem consultar as autoridades competentes antes de aplicarem o método LLNA: DA. Aconselha-se, portanto, a utilização rotineira, em paralelo, de um produto químico de controlo positivo, para evitar a eventual necessidade de ensaios suplementares em animais decorrente do recurso apenas periódico a esses produtos químicos de controlo (ver o ponto 12). No método LLNA: DA, o produto químico de controlo positivo deve induzir uma resposta positiva a um nível de exposição do qual se espere um aumento do índice de estimulação ≥ 1,8 em relação ao grupo de controlo negativo. Deve escolher-se a dosagem do produto químico de controlo positivo de modo que este não cause irritação cutânea excessiva nem toxicidade sistémica e que a indução seja reprodutível, mas não excessiva (considera-se excessivo um índice de estimulação superior a 10). Os produtos químicos de controlo positivo preferidos são aldeído hexilcinâmico (n.º CAS 101-86-0) a 25 % e eugenol (n.º CAS 97-53-0) a 25 % numa mistura de acetona e azeite na proporção volúmica 4:1. Em certas circunstâncias, e perante justificação adequada, podem utilizar-se outros produtos químicos de controlo positivo que cumpram os critérios atrás referidos.

12. Embora seja recomendada a inclusão, em paralelo, de um grupo de controlo positivo, em algumas situações pode justificar-se que um laboratório que aplique o método LLNA: DA regularmente (isto é, pelo menos uma vez por mês) efetue ensaios de controlo positivo apenas periódicos (a intervalos não superiores a seis meses) e mantenha uma base de dados histórica dos produtos químicos de controlo positivo que comprove a capacidade do laboratório de obter resultados reprodutíveis e exatos com esses produtos. A competência na execução do método LLNA: DA pode demonstrar-se obtendo resultados positivos constantes com um produto químico de controlo positivo em pelo menos 10 ensaios independentes efetuados num período razoável (menos de um ano).

13. Deve incluir-se em paralelo um grupo de controlo positivo sempre que haja alguma alteração processual do método LLNA: DA (por exemplo, alterações do pessoal formado, das matérias e/ou dos reagentes utilizados no método de ensaio, do equipamento utilizado neste último ou da origem dos animais estudados), devendo essas alterações ser documentadas nos relatórios laboratoriais. Deve analisar-se a incidência dessas alterações na adequação da base de dados históricos anteriormente estabelecida, ponderando a necessidade de criar uma nova base de dados históricos para documentar a coerência dos resultados obtidos com os produtos químicos de controlo positivo.

14. Os investigadores devem ter presente que a decisão de efetuar o estudo de produtos químicos de controlo positivo periodicamente, e não em paralelo, tem implicações na adequação e aceitabilidade dos resultados negativos dos estudos efetuados sem produto químico de controlo positivo em paralelo, no intervalo entre cada estudo de controlo positivo periódico. Por exemplo, se for obtido um resultado falso negativo num estudo de controlo positivo periódico, podem questionar-se os resultados negativos eventualmente obtidos para as substâncias em estudo no período compreendido entre o último estudo periódico aceitável de controlo positivo e o estudo periódico inaceitável de controlo positivo. Ao optar entre a inclusão em paralelo de produtos químicos de controlo positivo e um controlo positivo apenas periódico, devem ponderar-se cuidadosamente as consequências. Deve também ponderar-se a utilização de menos animais no grupo de controlo positivo em paralelo, se houver justificação científica para isso e se o laboratório demonstrar, com base em dados históricos próprios, que podem ser utilizados menos ratos (22).

▼M3

15. Embora se deva ensaiar o produto químico de controlo positivo num excipiente que reconhecidamente garanta coerência nas respostas (por exemplo, acetona e azeite na proporção volúmica 4:1), em determinadas situações regulamentares poderá ser também necessário efetuar o ensaio num excipiente não convencional (formulação clínica ou quimicamente pertinente) (23). Se o ensaio em paralelo de um produto químico de controlo positivo for efetuado com um excipiente diverso do da substância em estudo, deve incluir-se um controlo de excipiente para o produto químico de controlo positivo ensaiado em paralelo.

16. Se o estudo consistir na avaliação de substâncias de uma determinada classe química ou gama de respostas, o recurso a substâncias de referência pode ser útil para demonstrar que o método de ensaio funciona corretamente na deteção do potencial de sensibilização cutânea do tipo de substância em causa. Para que seja considerada adequada, uma substância de referência deve possuir as seguintes propriedades:

— semelhança estrutural e funcional com a classe de substâncias em estudo;

— características físico-químicas conhecidas;

— dados corroborantes do método LLNA: DA;

— dados corroborantes de outros modelos animais e/ou de ensaios em pessoas.

PROCEDIMENTO DE ENSAIO

Número de animais e níveis de dosagem

17. Utilizam-se, no mínimo, quatro animais por grupo de dosagem e um mínimo de três concentrações da substância em estudo, além de um grupo de controlo negativo em paralelo, tratado apenas com o excipiente da substância em estudo, e de um produto químico de controlo positivo (ensaiado em paralelo ou recentemente, consoante a política do laboratório acerca dos pontos 11 a 15). Deve ponderar-se o ensaio de várias doses do produto químico de controlo positivo, sobretudo quando este for ensaiado com intermitência. Os animais dos grupos de controlo devem ser manuseados e tratados de modo idêntico ao dos animais dos grupos tratados, exceto no que respeita à administração da substância em estudo.

18. A escolha da dosagem e do excipiente deve basear-se nas recomendações das referências (2) e (24). Selecionam-se normalmente as doses consecutivas numa série de concentrações adequada, por exemplo, 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 %, etc. A seleção das séries de concentração utilizadas deve ter fundamentação científica. Na escolha de três concentrações consecutivas de modo que a concentração mais elevada maximize a exposição, evitando ao mesmo tempo a ocorrência de toxicidade sistémica e irritação cutânea local excessiva, devem ser tidas em conta as informações toxicológicas (por exemplo, referentes a toxicidade aguda e irritação dérmica), bem como estruturais e físico-químicas, disponíveis sobre a substância em estudo (e/ou sobre substâncias estruturalmente afins) (24) (25). Na ausência de tais informações, pode ser necessário um ensaio exploratório prévio (ver os pontos 21 a 24).

19. O excipiente não deve interferir no resultado do ensaio nem distorcê-lo, devendo ser escolhido de modo a maximizar a solubilidade e a obter a maior concentração possível numa solução ou suspensão adequada para aplicação da substância em estudo. Constituem excipientes adequados uma mistura de acetona e azeite na proporção volúmica 4:1, a *N,N*-dimetilformamida, a metiletilcetona, o propilenoglicol e o sulfóxido dimetílico (6), mas podem utilizar-se outros, desde que com fundamentação científica. Em certas situações, pode ser necessário efetuar um controlo adicional com um solvente utilizado na prática clínica ou a formulação na qual a substância em estudo é comercializada. Deve ter-se especial cuidado em assegurar que as substâncias hidrófilas sejam incorporadas num sistema (excipiente) que molhe a pele e não escorra de imediato, acrescentando solubilizadores adequados (por exemplo, Pluronic® L92 a 1 %). Devem, portanto, evitar-se os excipientes totalmente aquosos.

▼M3

20. A utilização de gânglios linfáticos de ratos distintos possibilita a avaliação da variabilidade de animal para animal e a comparação estatística da diferença entre as medições relativas à substância em estudo e ao grupo de controlo do excipiente (ver o ponto 33). Por outro lado, só pode ponderar-se a redução do número de ratos no grupo de controlo positivo se os dados forem obtidos por animal (22). Além disso, algumas autoridades reguladoras exigem a apresentação de dados por animal. A recolha regular de dados por animal é vantajosa segundo critérios de bem-estar animal, evitando a duplicação de ensaios que seria necessária se os resultados relativos à substância em estudo anteriormente recolhidos de outro modo (por exemplo, agregação de dados relativa a séries de animais) tivessem de ser examinados ulteriormente por autoridades reguladoras com outras exigências (por exemplo, dados individualizados por animal).

Ensaio exploratório prévio

21. Na ausência de informações que permitam determinar a dosagem máxima a ensaiar (ver o ponto 18), é necessário efetuar um ensaio exploratório prévio, a fim de definir a dosagem adequada a ensaiar pelo método LLNA: DA. O objetivo deste ensaio exploratório consiste em fornecer orientações para a escolha da dosagem máxima a utilizar no estudo principal pelo método LLNA: DA, caso não se disponha de informações sobre a concentração que induz toxicidade sistémica (ver o ponto 24) e/ou irritação cutânea local excessiva (ver o ponto 23). A dosagem máxima estudada deve ser uma concentração de 100 % da substância em estudo, no caso dos líquidos, ou a concentração máxima possível, no caso dos sólidos e das suspensões.

22. O ensaio exploratório prévio é efetuado em condições idênticas às do estudo principal pelo método LLNA: DA, mas não se avalia a proliferação nos gânglios linfáticos e podem utilizar-se menos animais por grupo de dosagem. Sugere-se o recurso a um ou dois animais por grupo de dosagem. Observam-se diariamente todos os ratos para verificar se apresentam sinais clínicos de toxicidade sistémica ou de irritação no local de aplicação. Regista-se o peso corporal de cada rato antes do ensaio e antes de o eutanasiar (dia 8). Observam-se as orelhas para verificar se têm eritema e atribui-se-lhes uma pontuação de acordo com o quadro 1 (25). Mede-se a espessura das orelhas com um instrumento adequado – por exemplo, um micrómetro digital ou um leitor de espessuras da Peacock – no dia 1 (antes da primeira dose), no dia 3 (cerca de 48 horas após a primeira dose), no dia 7 (24 horas antes do termo do ensaio) e no dia 8. Complementarmente, no dia 8 pode determinar-se a espessura das orelhas por pesagem de punções auriculares efetuadas depois da eutanásia dos animais. Uma pontuação de eritema $\geq$ 3 e/ou o aumento da espessura auricular em 25 % ou mais em qualquer dia de medição constituem indicadores de irritação local excessiva (26) (27). Para dosagem mais elevada no estudo principal pelo método LLNA: DA, deve ser escolhida a dosagem da série de concentrações do ensaio exploratório prévio (ver o ponto 18) imediatamente inferior à que induz toxicidade sistémica e/ou irritação cutânea local excessiva.

Quadro 1

Pontuações de eritema

Observação	Pontuação
Ausência de eritema	0
Eritema muito ligeiro (quase impercetível)	1
Eritema bem definido	2

▼M3

Observação	Pontuação
Eritema moderado a intenso	3
Eritema intenso (vermelhidão roxa) ou formação de escara que impede a pontuação do eritema	4

23. Além do referido acerca do aumento de 25 % da espessura auricular (26) (27), também se recorreu a aumentos estatisticamente significativos da espessura auricular dos ratos tratados, comparativamente aos ratos de controlo, para identificar produtos irritantes pelo método LLNA (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Os aumentos estatisticamente significativos da espessura auricular inferiores a 25 % não foram, porém, especificamente associados a irritação excessiva (30) (31) (32) (33) (34).

24. Quando efetuadas no âmbito de uma avaliação integrada, as seguintes observações clínicas podem indiciar toxicidade sistémica (35), podendo assim indicar a dosagem máxima a utilizar no método LLNA: DA principal: alterações do funcionamento do sistema nervoso (por exemplo, piloereção, ataxia, tremores e convulsões); alterações comportamentais (por exemplo, agressividade, alterações das atividades higiénicas, alterações pronunciadas de atividade); alterações respiratórias (alterações da frequência e da intensidade da respiração, como dispneia, arfar e pieira) e da ingestão de alimentos e de água. Devem ainda ser tidos em conta na avaliação os sinais de letargia e/ou de apatia e quaisquer sinais clínicos de dor ou sofrimento mais do que ligeiros ou momentâneos, ou reduções de peso corporal superiores a 5 % entre o dia 1 e o dia 8, bem como a mortalidade. Os animais moribundos e os animais que manifestem grande sofrimento ou sinais de dor intensa devem ser eutanasiados (36).

Sequência experimental do estudo principal

25. A sequência experimental do ensaio é a seguinte:

— *Dia 1:* Identificar individualmente e anotar o peso de cada animal e todas as observações clínicas. Aplicar no dorso de cada orelha solução aquosa a 1 % de laurilsulfato de sódio, utilizando uma escova molhada nessa solução, de modo a cobrir a totalidade do dorso de cada orelha com quatro ou cinco pinceladas. Uma hora após o tratamento com esta solução de laurilsulfato de sódio, aplicar no dorso de cada orelha 25 µl da diluição adequada da substância em estudo, do excipiente sozinho ou do produto químico de controlo positivo (ensaiado em paralelo ou recentemente, consoante a política do laboratório acerca dos pontos 11 a 15).

— *Dias 2, 3 e 7:* Repetir o pré-tratamento com a solução aquosa a 1 % de laurilsulfato de sódio e o procedimento de aplicação da substância em estudo efetuados no dia 1.

— *Dias 4, 5 e 6:* Nenhum tratamento.

— *Dia 8:* Anotar o peso de cada animal e todas as observações clínicas. Eutanasiar os animais 24 a 30 horas, aproximadamente, após o início da aplicação no dia 7. Excisar os gânglios linfáticos auriculares de drenagem, das orelhas de cada rato, e colocá-los em solução-tampão de fosfato (PBS), separadamente para cada animal. Para pormenores e esquemas da identificação e dissecação dos gânglios linfáticos, ver a referência (22). A fim de melhor avaliar a resposta cutânea local no estudo principal, podem ser incluídos no protocolo de estudo parâmetros suplementares como a pontuação do eritema auricular ou medições da espessura auricular (com um medidor de espessura ou por pesagem de punções auriculares *post mortem*).

▼M3

Preparação das suspensões celulares

26. Preparar suspensões unicelulares de células dos gânglios linfáticos colocando os gânglios excisados bilateralmente de cada rato entre duas lâminas de vidro e aplicando uma pressão ligeira, para os esmagar. Depois de confirmar que os tecidos exsudaram dos gânglios, separar cuidadosamente as duas lâminas. Colocar os tecidos de ambas as lâminas em suspensão em PBS, inclinando cada lâmina por cima de uma placa de Petri e lavando com PBS, enquanto se raspam os tecidos da lâmina com um raspador de células. Os gânglios linfáticos dos animais de controlo negativo são pequenos, pelo que é necessário proceder com cuidado para evitar efeitos artificiais nos valores do índice de estimulação. Deve utilizar-se 1 ml de PBS para lavar as duas lâminas. Utilizando o raspador de células, homogeneizar com cuidado a suspensão de células de gânglios linfáticos na placa de Petri. Com uma micropipeta, colher uma alíquota de 20 µl da suspensão dessas células, tendo o cuidado de não incluir a membrana, visível a olho nu. Misturar com 1,98 ml de PBS, para obter uma amostra de 2 ml. Preparar do mesmo modo uma segunda amostra de 2 ml, de maneira que se obtenham duas amostras por animal.

Determinação da proliferação celular (medição do teor de ATP dos linfócitos)

27. Mede-se o aumento do teor de ATP dos gânglios linfáticos recorrendo ao método da luciferina/luciferase utilizando um conjunto de medição de ATP, que mede a bioluminescência em unidades de luminescência relativa (ULR). O tempo que decorre entre a eutanásia do animal e a medição do teor de ATP que lhe corresponde deve ser uniforme, não devendo exceder cerca de 30 minutos, pois considera-se que o teor de ATP decresce gradualmente após a morte do animal (12). Assim, o processo compreendido entre a excisão dos gânglios linfáticos auriculares e a medição do ATP deve estar concluído ao fim de 20 minutos, seguindo uma cronologia pré-estabelecida idêntica para todos os animais. Mede-se a luminescência de ATP em cada amostra de 2 ml, obtendo-se, portanto, duas medições de ATP por animal. Determina-se então a luminescência média de ATP, cujo valor é subsequentemente utilizado nos cálculos (ver o ponto 30).

OBSERVAÇÕES

Observações clínicas

28. Observar cuidadosamente cada rato pelo menos uma vez por dia, com vista à deteção de sinais clínicos, quer de irritação local no ponto de aplicação, quer de toxicidade sistémica. Anotar todas as observações, mantendo um registo para cada rato. Os planos de controlo devem incluir critérios para identificar prontamente os ratos que evidenciem níveis de toxicidade sistémica, irritação cutânea local excessiva ou corrosão da pele passíveis de justificarem a eutanásia do animal (36).

Pesos corporais

29. Tal como referido no ponto 25, mede-se o peso corporal de cada animal no início do ensaio e quando da eutanásia programada.

CÁLCULO DOS RESULTADOS

30. Os resultados correspondentes a cada grupo de tratamento exprimem-se em índice de estimulação (EI) médio. Determina-se o índice de estimulação dividindo a média das unidades de luminescência relativa/rato, correspondente a cada grupo tratado com a substância em estudo e ao grupo de controlo positivo, pela média das unidades de luminescência relativa/rato do grupo de controlo do solvente/excipiente. O índice de estimulação médio para o grupo de controlo tratado com o excipiente é igual a 1.

▼M3

31. Para efeitos de decisão, consideram-se positivos os resultados de índice de estimulação ≥ 1,8 (10). Todavia, ao ponderar se um resultado próximo do limite (índice de estimulação compreendido entre 1,8 e 2,5) deve ou não ser considerado positivo, podem ter-se também em conta o grau de resposta à dosagem, a significância estatística e a coerência das respostas correspondentes ao solvente/excipiente e à substância de controlo positivo (2), (3) (37).

32. No caso das respostas positivas próximas do limite, com índice de estimulação compreendido entre 1,8 e 2,5, pode ser útil aos utilizadores terem em conta, juntamente com os valores de índice de estimulação, informações adicionais como a resposta à dosagem, sinais de toxicidade sistémica ou de irritação excessiva e, se for caso disso, a significância estatística, para confirmar se os resultados obtidos são positivos (10). Devem examinar-se também as propriedades da substância em estudo, nomeadamente se esta possui estrutura semelhante a sensibilizantes cutâneos conhecidos ou causa irritação cutânea excessiva nos ratos, bem como a natureza da resposta à dosagem observada. Na referência (4) analisam-se em pormenor estes e outros aspetos.

33. A recolha de dados para cada rato possibilita uma análise estatística da existência, nos dados, de indicações de resposta à dosagem e do grau desta resposta. A avaliação estatística pode incluir uma avaliação da resposta à dosagem e comparações, convenientemente adaptadas, de grupos estudados (por exemplo, comparações par a par de um grupo correspondente a uma determinada dosagem com o grupo de controlo tratado com o solvente/excipiente ensaiado em paralelo). As análises estatísticas podem incluir, por exemplo, regressões lineares ou testes de William, para analisar tendências de resposta à dosagem, e testes de Dunnett, para comparações par a par. Na escolha de um método de análise estatística apropriado, o investigador deve estar atento a possíveis divergências das variâncias e a outros problemas conexos passíveis de exigirem uma transformação dos dados ou uma análise estatística não-paramétrica. O investigador pode ainda ter de efetuar os cálculos de índice de estimulação e as análises estatísticas considerando alguns pontos e descartando outros (por vezes denominados «aberrantes»).

DADOS E RELATÓRIOS

Dados

34. Os dados devem ser resumidos em quadros, indicando os valores de ULR correspondentes a cada animal, a média de ULR/animal do grupo, o parâmetro estatístico associado (desvio-padrão ou erro-padrão da média, por exemplo) e o índice de estimulação médio para cada grupo de dosagem, comparativamente ao grupo de controlo do solvente/excipiente ensaiado em paralelo.

Relatório do ensaio

35. O relatório do ensaio deve incluir as seguintes informações:

Produtos químicos em estudo e de controlo:

— dados de identificação (por exemplo, números CAS e CE – caso existam –, origem, grau de pureza, impurezas conhecidas, número de lote),

— natureza física e propriedades físico-químicas (por exemplo, volatilidade, estabilidade, solubilidade),

— no caso de misturas, composição e percentagens relativas dos componentes;

Solvente/excipiente:

— dados de identificação (grau de pureza, concentração – se adequado –, volume utilizado),

— justificação da escolha do excipiente;

▼**M3**

Animais utilizados nos ensaios:

— origem dos ratos CBA,

— estado microbiológico dos animais, caso seja conhecido,

— número e idade dos animais,

— origem dos animais, condições de alojamento, dieta, etc.;

Condições de ensaio:

— origem, número de lote e dados de garantia de qualidade/controlo de qualidade do fabricante para o conjunto de medição do ATP,

— elementos sobre a preparação e aplicação da substância em estudo,

— justificação das dosagens escolhidas, incluindo os resultados do ensaio exploratório prévio, caso tenha sido efetuado,

— concentrações do excipiente e da substância em estudo utilizadas e quantidade total desta aplicada,

— elementos sobre a qualidade dos alimentos e da água (incluindo o tipo de dieta e a origem desta, bem como a origem da água),

— elementos sobre a organização cronológica dos tratamentos e da colheita das amostras,

— métodos de medição da toxicidade,

— critérios definidos para que o estudo seja considerado positivo ou negativo,

— elementos sobre eventuais desvios ao protocolo e explicação do modo como estes afetam a realização e os resultados do estudo;

Verificação da fiabilidade:

— resumo dos resultados da última verificação de fiabilidade, incluindo informações sobre a substância em estudo, a concentração e o excipiente utilizados,

— dados do laboratório relativos a controlos positivos ensaiados em paralelo e/ou históricos e a controlos negativos (solvente/excipiente) ensaiados em paralelo,

— se não tiver sido efetuado em paralelo um controlo positivo, a data do controlo positivo periódico mais recente e o relatório laboratorial correspondente, bem como um relatório que especifique os dados históricos de controlos positivos do laboratório nos quais se baseou a decisão de não efetuar um controlo positivo paralelo;

Resultados:

— peso de cada rato no início da dosagem e na altura da sua morte programada, bem como a média e o parâmetro estatístico associado (desvio-padrão ou erro-padrão da média, por exemplo), para cada grupo de tratamento,

— surgimento e evolução de sinais de toxicidade, incluindo irritação dérmica no local da aplicação (caso ocorra), para cada animal,

— cronologia da morte e da medição do ATP, para cada animal,

— quadro de valores de ULR e de índices de estimulação para cada grupo de dosagem, por rato,

— média e parâmetro estatístico associado (desvio-padrão ou erro-padrão da média, por exemplo) de ULR/rato, para cada grupo de tratamento, e resultados da análise dos pontos aberrantes, também para cada grupo de tratamento,

▼M3

— índice de estimulação calculado e medida adequada da variabilidade de animal para animal, relativamente à substância em estudo e nos grupos de controlo,

— resposta à dosagem,

— análises estatísticas que se justifiquem;

Análise dos resultados:

— comentário breve sobre os resultados obtidos; análise da resposta à dosagem, análises estatísticas que se justifiquem e conclusão sobre a classificação, ou não, da substância em estudo como sensibilizante cutânea.

REFERÊNCIAS

(1) OCDE (2010). Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay. Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals. OCDE, Paris. Disponível em: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(2) Chamberlain, M., Basketter, D.A. (1996). The local lymph node assay: status of validation. *Food Chem, Toxicol*., 34, 999-1002.

(3) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I., Loveless, S.E. (1996). The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol*., 34, 985-997.

(4) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. (1998). Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.*, 36, 327-333.

(5) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J., Van Loveren, H. (2000). A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. *Toxicol*., 146, 49-59.

(6) ICCVAM (1999). The murine local lymph node assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Disponível em: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf].

(7) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001). ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34, 258-273.

(8) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001). ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. *Reg. Toxicol. Pharmacol*., 34, 274-286.

(9) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001). ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process.*Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34, 249-257.

(10) ICCVAM (2010). ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: modified by Daicel Chemical Industries, Ltd., based on ATP content test method protocol (LLNA: DA). NIH Publication No. 10-7551A/B. Research Triangle Park, NC. National Institute of Environmental Health Sciences. Disponível em: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-DA/TMER.htm].

▼**M3**

(11) ICCVAM (2009). Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC. National Institute of Environmental Health Sciences. Disponível em: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPRept2009.pdf].

(12) Idehara, K., Yamagishi, G., Yamashita, K., Ito, M. (2008). Characterization and evaluation of a modified local lymph node assay using ATP content as a non-radio isotopic endpoint.*J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 58, 1-10.

(13) Omori, T., Idehara, K., Kojima, H., Sozu, T., Arima, K., Goto, H., Hanada, T., Ikarashi, Y., Inoda, T., Kanazawa, Y., Kosaka, T., Maki, E., Morimoto, T., Shinoda, S., Shinoda, N., Takeyoshi, M., Tanaka, M., Uratani, M., Usami, M., Yamanaka, A., Yoneda, T., Yoshimura, I., Yuasa, A. (2008). Interlaboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on adenosine triphosphate measurement. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 58, 11-26.

(14) OCDE (1992). Skin Sensitisation. Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals. OCDE, Paris. Disponível em: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(15) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C., Wendel, A. (2008). Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). *Food Chem. Toxicol*., 46, 1896-1904.

(16) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrillo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R., Mehling, A. (2009). Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. *Reg. Toxicol. Pharmacol*., 55, 90-96.

(17) Crouch, S.P., Kozlowski, R., Slater, K.J., Fletcher J. (1993). The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J. Immunol. Meth*., 160, 81-88.

(18) Ishizaka, A., Tono-oka, T., Matsumoto, S. (1984). Evaluation of the proliferative response of lymphocytes by measurement of intracellular ATP. *J. Immunol. Meth*., 72, 127-132.

(19) Dexter, S.J., Cámara, M., Davies, M., Shakesheff, K.M. (2003). Development of a bioluminescent ATP assay to quantify mammalian and bacterial cell number from a mixed population. *Biomat.*, 24, 27-34.

(20) Lundin A. (2000). Use of firefly luciferase in ATP-related assays of biomass, enzymes, and metabolites. *Meth. Enzymol*., 305, 346-370.

(21) ILAR (1996). Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 7.ª edição. Washington, DC. National Academies Press.

(22) ICCVAM (2009). Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay. NIH Publication Number 09-7357. Research Triangle Park, NC. National Institute of Environmental Health Science. Disponível em: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf].

(23) McGarry, H.F. (2007). The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. *Toxicol*., 238, 71-89.

(24) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W., Basketter, D.A. (1994). The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicol*., 93, 13-31.

(25) OCDE (2002). Acute Dermal Irritation/Corrosion. Test Guideline No. 404, Guidelines for Testing of Chemicals. OCDE, Paris. Disponível em: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

▼M3

(26) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L., DeGeorge, G.L. (2007). Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. *Toxicologist*, 96, 235.

(27) ICCVAM (2009). Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC. National Institute of Environmental Health Sciences. Disponível em: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf].

(28) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S., Meade, B.J. (1998). Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. *Drug. Chem. Toxicol*., 21, 195-206.

(29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P., Vohr, V.W. (1998). An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 153, 83-94.

(30) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B., Meade, B.J. (1998). A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. *Toxicol. Meth.*, 8, 245-256.

(31) Hayes, B.B., Meade, B.J. (1999). Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. *Drug Chem. Toxicol*., 22, 491-506.

(32) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R., Vohr, H.W. (2005). A European interlaboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol*., 212, 60-68.

(33) Vohr, H.W., Ahr, H.J. (2005). The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol*., 79, 721-728.

(34) Patterson, R.M., Noga, E., Germolec, D. (2007). Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract. *Environ. Health Perspect*., 115, 1023-1028.

(35) ICCVAM (2009). Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing *In Vitro* Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC. National Institute of Environmental Health Sciences. Disponível em: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm].

(36) OCDE (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7. OCDE, Paris. Disponível em: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(37) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E., Hastings, K.L. (1998). Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. *J. Toxicol. Environ. Health*, 53, 563-79.

(38) OCDE (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO (2005)14. OCDE, Paris. Disponível em: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

▼**M3**

Apêndice 1

DEFINIÇÕES

Exatidão: Grau de acordo entre os resultados do método de ensaio e os valores de referência aceites. Constitui uma medida do desempenho do método e um dos aspetos da adequação. Este termo e o termo «concordância» são muitas vezes utilizados indistintamente para indicar a proporção de resultados corretos de um método de ensaio (38).

Substância de referência: Substância (sensibilizante ou não) utilizada como termo de comparação com a substância em estudo. Deve ter as seguintes propriedades: i) origem ou origens uniformes e fiáveis; ii) similaridade estrutural e funcional com a classe de substâncias em estudo; iii) características físico-químicas conhecidas; iv) disponibilidade de dados sobre os efeitos conhecidos; e v) potência conhecida situada na gama de reação pretendida.

Falso negativo: Substância incorretamente considerada negativa ou inativa pelo método de ensaio, quando na realidade é positiva ou ativa.

Falso positivo: Substância incorretamente considerada positiva ou ativa pelo método de ensaio, quando na realidade é negativa ou inativa.

Perigo: Potencial de efeitos adversos na saúde ou no ambiente, que só se manifestam se o grau de exposição for suficiente.

Reprodutibilidade interlaboratorial: Medida do grau em que laboratórios qualificados diferentes, utilizando o mesmo protocolo para ensaiar a mesma substância em estudo, conseguem obter resultados qualitativa e quantitativamente similares. Determina-se durante os processos de pré-validação e de validação. Indica em que medida um ensaio pode ser transferido com êxito para outro laboratório e também se designa por «reprodutibilidade entre laboratórios» (38).

Reprodutibilidade intralaboratorial: Medida do grau em que pessoal qualificado do mesmo laboratório nele consegue repetir resultados com êxito, em momentos diferentes, utilizando o mesmo protocolo. Também se designa por «reprodutibilidade no laboratório» (38).

Ponto aberrante: Observação que difere marcadamente dos outros valores de uma amostra aleatória de uma população.

Garantia de qualidade: Processo de gestão no âmbito do qual a observância das normas de ensaio, das exigências e dos procedimentos de conservação de registos laboratoriais, bem como a exatidão dos dados transferidos, são avaliadas por pessoas independentes das que efetuam os ensaios.

Fiabilidade: Medida em que, utilizando o mesmo protocolo, um método de ensaio pode ser continuadamente reproduzido no mesmo laboratório e em laboratórios diferentes. A fiabilidade é avaliada com base nos valores calculados das reprodutibilidades intralaboratorial e interlaboratorial (38).

Sensibilização cutânea: Processo imunológico que se manifesta quando um indivíduo sensível é exposto, por via tópica, a um alergénio químico indutor de uma resposta imunológica cutânea passível de gerar sensibilização por contacto.

Índice de estimulação (IE): Valor calculado para quantificar o potencial de sensibilização cutânea das substâncias estudadas; corresponde à razão entre a proliferação nos grupos tratados e a proliferação no grupo de controlo do excipiente ensaiado em paralelo.

Substância em estudo (ou produto químico em estudo): Qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado o presente método de ensaio.

▼M3

B.51. SENSIBILIZAÇÃO CUTÂNEA: ENSAIO DE GÂNGLIOS LINFÁTICOS LOCAIS: BRDU-ELISA

INTRODUÇÃO

1. As Diretrizes da OCDE para o ensaio de produtos químicos (*OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*) e os métodos de ensaio da UE são revistos periodicamente à luz do progresso científico, das necessidades normativas em evolução e de considerações de bem-estar animal. O primeiro método de ensaio utilizado para determinar a sensibilização cutânea no rato – o ensaio de gânglios linfáticos locais (método LLNA, «*Local Lymph Node Assay*», *Test Guideline* 429 da OCDE, capítulo B.42 deste anexo) foi revisto (1 e capítulo B.42 deste anexo). Foram publicados em (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) elementos pormenorizados sobre a validação do método LLNA, bem como uma revisão dos trabalhos conexos. No método LLNA utiliza-se iodo radioativo ou timidina radioativa para medir a proliferação de linfócitos, pelo que o recurso a este ensaio está limitado sempre que a aquisição, utilização e eliminação de matérias radioativas for problemática. O método «LLNA: BrdU-ELISA» (ELISA: «*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*») é uma versão modificada do método LLNA: não utiliza matérias radioativas, recorrendo à 5-bromo2-desoxiuridina (BrdU) não-radioativa (n.º CAS 59-14-3) num sistema de ensaio ELISA para medir a proliferação de linfócitos. O método foi validado e examinado, tendo sido recomendado por um painel de avaliação científica internacional constituído por peritos independentes devido à sua utilidade para a identificação de produtos químicos sensibilizantes e não sensibilizantes da pele, com algumas limitações (10) (11) (12). O método foi concebido para avaliar o potencial de sensibilização da pele de animais por produtos químicos (substâncias e misturas). O capítulo B.6 deste anexo e o *Test Guideline* 406 da OCDE recorrem a ensaios em cobaias, nomeadamente o ensaio de maximização na cobaia e o ensaio de Buehler (13). O método LLNA (capítulo B.42 deste anexo, *Test Guideline* 429 da OCDE) e as duas alterações do mesmo que não recorrem a matérias radioativas (LLNA: BrdU-ELISA – capítulo B.51 deste anexo, *Test Guideline* 442 B da OCDE – e LLNA: DA – capítulo B.50 deste anexo, *Test Guideline* 442 A da OCDE) apresentam vantagens em relação aos ensaios na cobaia descritos no capítulo B.6 e no *Test Guideline* 406 da OCDE (13), traduzidas na redução e no aperfeiçoamento do recurso a animais.

2. O método LLNA: BrdU-ELISA é similar ao método LLNA. Estuda a fase indutora da sensibilização cutânea e fornece dados quantitativos adequados para a avaliação da resposta à dosagem. Por outro lado, o facto de permitir detetar sensibilizantes cutâneos sem necessidade de utilizar marcadores radioativos do ADN elimina as questões potenciais em matéria de exposição profissional à radioatividade e de eliminação de resíduos. O presente método possibilita a utilização crescente de ratos na deteção de sensibilizantes cutâneos, o que facilita a redução do recurso a cobaias em ensaios de potencial de sensibilização cutânea (capítulo B6, *Test Guideline* 406 da OCDE) (13).

DEFINIÇÕES

3. As definições utilizadas figuram no apêndice 1.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES

4. O método LLNA: BrdU-ELISA é um método LLNA modificado para a identificação de produtos químicos potencialmente sensibilizantes da pele, com determinadas limitações. Isso não implica, necessariamente, que o método LLNA: BrdU-ELISA deva ser sempre utilizado em substituição do método LLNA ou de ensaios em cobaias (método B.6, *Test Guideline* 406 da OCDE) (13), mas apenas que é equivalente aos segundos e pode ser utilizado em alternativa, gerando normalmente resultados positivos ou negativos que dispensam confirmação (10) (11). Antes de efetuar o estudo, o laboratório deve examinar todas as informações disponíveis sobre a substância em causa, nomeadamente a identificação e a estrutura química, as

▼M3

propriedades físico-químicas, os resultados de quaisquer outros ensaios *in vitro* ou *in vivo* de toxicidade da substância e dados toxicológicos sobre produtos químicos com estrutura semelhante. Esse exame destina-se a determinar se o método LLNA: BrdU-ELISA se adequa à substância em estudo (dada a incompatibilidade de alguns tipos de produtos químicos com o método LLNA: BrdU-ELISA – ver o ponto 5), bem como a facilitar a escolha das dosagens.

5. O método LLNA: BrdU-ELISA é um método *in vivo*, não eliminando, portanto, a utilização de animais na avaliação da atividade sensibilizante alérgica por contacto. Pode, no entanto, reduzir o recurso a animais para estes fins, quando comparado com os ensaios na cobaia (método B.6 e *Test Guideline* 406 da OCDE) (13). Além disso, proporciona melhorias substanciais no modo como os animais são utilizados nos ensaios de sensibilização alérgica por contacto, uma vez que, ao contrário do método B.6 e do *Test Guideline* 406 da OCDE, não exige a indução de reações de hipersensibilidade dérmica por agentes externos. Também não implica a utilização de nenhum adjuvante, ao contrário do que sucede no ensaio de maximização na cobaia (capítulo B.6 do presente anexo, 13), reduzindo a dor e o sofrimento causados aos animais. Apesar das vantagens do método LLNA: BrdU-ELISA em relação ao método B.6 e ao *Test Guideline* 406 da OCDE (13), existem limitações que podem exigir o recurso a estes últimos, por exemplo, para ensaiar certos metais, em virtude dos resultados falsos positivos que se obtêm com certos irritantes cutâneos (como algumas substâncias tensioativas) (6) – 1 e capítulo B.42 do presente anexo – ou devido a problemas de solubilidade da substância em estudo. Por outro lado, no caso das substâncias ou classes de substâncias químicas com grupos funcionais que, comprovadamente, suscitem dúvidas (15), pode ser necessário recorrer a ensaios em cobaias – método B.6, *Test Guideline* 406 da OCDE (13). Relativamente ao método LLNA: BrdU-ELISA, foi recomendado que se ponderam também as limitações identificadas para o método LLNA (1 e capítulo B.42 do presente anexo) (10). Salvaguardadas estas limitações, o método LLNA: BrdU-ELISA é potencialmente aplicável ao ensaio de qualquer produto químico, a menos que este possua alguma propriedade passível de comprometer a exatidão do método. Deve ainda ser ponderada a possibilidade de obtenção de resultados positivos próximos do limite caso os valores de índice de estimulação (IE) estejam compreendidos entre 1,6 e 1,9 (ver os pontos 31 e 32). Estas reticências baseiam-se nos dados de validação de 43 substâncias com índice de estimulação igual ou superior a 1,6 (ver o ponto 6), nas quais o método LLNA: BrdU-ELISA identificou corretamente todas as 32 substâncias classificadas de sensibilizantes pelo método LLNA, mas identificou incorretamente duas das 11 substâncias com índice de estimulação compreendido entre 1,6 e 1,9 (resultado positivo próximo do limite) classificadas de não-sensibilizantes pelo método LLNA (10). Todavia, como se utilizou o mesmo conjunto de dados para fixar os valores de índice de estimulação e calcular as propriedades de previsão do ensaio, os resultados referidos podem traduzir uma sobrestimação das reais propriedades de previsão do método.

PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

6. O princípio básico subjacente ao método LLNA: BrdU-ELISA é que os sensibilizantes induzem uma proliferação de linfócitos nos gânglios linfáticos drenantes do local de aplicação da substância em estudo. Esta proliferação é proporcional à dosagem e à potência do alergénio aplicado e constitui um modo simples de obter uma medida quantitativa da sensibilização. Mede-se a proliferação e compara-se a proliferação média em cada grupo estudado com a proliferação média no grupo de controlo tratado com o excipiente. Determina-se a razão entre a proliferação média em cada grupo tratado e a proliferação observada em paralelo no grupo de controlo tratado com o excipiente; esta razão é denominada índice de estimulação (IE). Para que uma substância em estudo possa ser classificada de sensibilizante cutânea potencial, este índice deve ser $\geq 1{,}6$. O presente método baseia-se na

▼M3

medição do teor de bromodesoxiuridina como indicador do aumento do número de células em proliferação nos gânglios linfáticos drenantes do sistema auricular. A bromodesoxiuridina é um composto análogo da timidina e é similar o modo como se processa a sua incorporação no ADN das células em proliferação. Mede-se a incorporação da bromodesoxiuridina pelo método ELISA, que utiliza um anticorpo específico daquela também marcado com peroxidase. Ao adicionar-se o substrato, a peroxidase reage com este produzindo um produto corado, que é determinado quantitativamente, a uma absorvância específica, por meio de um leitor de placas de microtitulação.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

Escolha da espécie animal

7. O rato é a espécie escolhida para este ensaio. Os estudos de validação do método LLNA: BrdU-ELISA foram efetuados exclusivamente com a estirpe CBA/JN, que é portanto considerada a estirpe preferida (10) (12). Utilizam-se fêmeas adultas jovens, nulíparas e não grávidas. No início do estudo, os animais devem ter entre oito e 12 semanas; a variação de peso dos animais entre si deve ser mínima e não deve exceder 20 % do peso médio dos mesmos. Podem ser utilizadas outras estirpes, bem como machos, quando houver dados suficientes que demonstrem não existirem diferenças significativas na resposta ao método LLNA: BrdU-ELISA relacionadas com a estirpe e/ou o sexo do animal.

Condições de alojamento e alimentação

8. Os ratos devem ser alojados em grupo (16), a menos que se justifique cientificamente o seu alojamento individual. A temperatura do biotério deve ser de 22 °C ± 3 °C. A humidade relativa não deve ser inferior a 30 % e, de preferência, não deve exceder 70 %, exceto durante a limpeza do biotério. Idealmente, deve procurar manter-se entre 50 % e 60 %. A iluminação deve ser artificial, com uma sequência de 12 horas de luz seguidas de 12 horas de escuridão. Na alimentação, podem utilizar-se dietas convencionais de laboratório e deve ser fornecida água de beber sem restrições.

Preparação dos animais

9. Os animais são selecionados aleatoriamente, marcados de modo a permitir a identificação individual (mas não por marcação nas orelhas) e mantidos em gaiolas durante, pelo menos, cinco dias antes da aplicação das doses, para permitir a aclimatação às condições do laboratório. Antes do início do tratamento, examinam-se os animais, de modo a assegurar que não apresentam lesões cutâneas visíveis.

Preparação das soluções a aplicar

10. Antes da aplicação nas orelhas dos ratos, os produtos químicos sólidos dissolvem-se ou suspendem-se em solventes/excipientes e, se necessário, diluem-se. Os produtos líquidos podem ser aplicados tal e qual ou ser diluídos antes da aplicação. Os produtos químicos insolúveis, como os geralmente presentes nos dispositivos médicos, devem ser sujeitos a um processo de extração exaustivo com um solvente apropriado, a fim de nele concentrar para o ensaio todos os componentes extraíveis, antes da aplicação nas orelhas dos ratos. As substâncias em estudo devem ser preparadas diariamente, a menos que haja dados de estabilidade que demonstrem ser aceitável o seu armazenamento.

Verificação da fiabilidade

11. Utilizam-se produtos químicos de controlo positivo para demonstrar o desempenho adequado do ensaio, devendo obter-se uma resposta quantitativamente bem caracterizada, com sensibilidade adequada e reprodutível, a essas substâncias sensibilizantes. Recomenda-se a inclusão, em paralelo, de um produto químico de controlo positivo, para demonstrar a competência do laboratório na execução de cada ensaio e possibilitar a avaliação da reprodutibilidade e comparabilidade intra e interlaboratoriais. Algumas autoridades reguladoras exigem também um produto químico de controlo positivo em cada estudo, pelo que os laboratórios devem consultar as autoridades competentes antes de aplicarem o método LLNA: BrdU-ELISA. Aconselha-se, portanto, a utilização rotineira, em paralelo, de um produto químico de controlo positivo, para evitar a eventual necessidade de ensaios suplementares em animais decorrente do recurso apenas periódico a esses

▼M3

produtos químicos de controlo (ver o ponto 12). No método LLNA: BrdU-ELISA, o produto químico de controlo positivo deve induzir uma resposta positiva a um nível de exposição do qual se espere um aumento do índice de estimulação ≥ 1,6 em relação ao grupo de controlo negativo. Deve escolher-se a dosagem do produto químico de controlo positivo de modo que este não cause irritação cutânea excessiva nem toxicidade sistémica e que a indução seja reprodutível, mas não excessiva (considera-se excessivo um índice de estimulação superior a 14). Os produtos químicos de controlo positivo preferidos são aldeído hexilcinâmico (n.º CAS 101-86-0) a 25 % e eugenol (n.º CAS 97-53-0) a 25 % numa mistura de acetona e azeite na proporção volúmica 4:1. Em certas circunstâncias, e perante justificação adequada, podem utilizar-se outros produtos químicos de controlo positivo que cumpram os critérios atrás referidos.

12. Embora seja recomendada a inclusão, em paralelo, de um grupo de controlo positivo, em algumas situações pode justificar-se que um laboratório que aplique o método LLNA: BrdU-ELISA regularmente (isto é, pelo menos uma vez por mês) efetue ensaios de controlo positivo apenas periódicos (a intervalos não superiores a seis meses) e mantenha uma base de dados histórica dos produtos químicos de controlo positivo que comprove a capacidade do laboratório de obter resultados reprodutíveis e exatos com esses produtos. A competência na execução do método LLNA: BrdU-ELISA pode demonstrar-se obtendo resultados positivos constantes com um produto químico de controlo positivo em pelo menos 10 ensaios independentes efetuados num período razoável (menos de um ano).

13. Deve incluir-se em paralelo um grupo de controlo positivo sempre que haja alguma alteração processual do método LLNA: BrdU-ELISA (por exemplo, alterações do pessoal formado, das matérias e/ou dos reagentes utilizados no método de ensaio, do equipamento utilizado neste último ou da origem dos animais estudados), devendo essas alterações ser documentadas nos relatórios laboratoriais. Deve analisar-se a incidência dessas alterações na adequação da base de dados históricos anteriormente estabelecida, ponderando a necessidade de criar uma nova base de dados históricos para documentar a coerência dos resultados obtidos com os produtos químicos de controlo positivo.

14. Os investigadores devem ter presente que a decisão de efetuar o estudo de produtos químicos de controlo positivo periodicamente, e não em paralelo, tem implicações na adequação e aceitabilidade dos resultados negativos dos estudos efetuados sem produto químico de controlo positivo em paralelo, no intervalo entre cada estudo de controlo positivo periódico. Por exemplo, se for obtido um resultado falso negativo num estudo de controlo positivo periódico, podem questionar-se os resultados negativos eventualmente obtidos para as substâncias em estudo no período compreendido entre o último estudo periódico aceitável de controlo positivo e o estudo periódico inaceitável de controlo positivo. Ao optar entre a inclusão em paralelo de produtos químicos de controlo positivo e um controlo positivo apenas periódico, devem ponderar-se cuidadosamente as consequências. Deve também ponderar-se a utilização de menos animais no grupo de controlo positivo em paralelo, se houver justificação científica para isso e se o laboratório demonstrar, com base em dados históricos próprios, que podem ser utilizados menos ratos (17).

15. Embora se deva ensaiar o produto químico de controlo positivo num excipiente que reconhecidamente garanta coerência nas respostas (por exemplo, uma mistura de acetona e azeite na proporção volúmica 4:1), em determinadas situações regulamentares poderá ser também necessário efetuar o ensaio num excipiente não convencional (formulação clínica ou quimicamente pertinente) (18). Se o ensaio em paralelo de um produto químico de controlo positivo for efetuado com um excipiente diverso do da substância em estudo, deve incluir-se um controlo de excipiente para o produto químico de controlo positivo ensaiado em paralelo.

▼M3

16. Se o estudo consistir na avaliação de substâncias de uma determinada classe química ou gama de respostas, o recurso a substâncias de referência pode ser útil para demonstrar que o método de ensaio funciona corretamente na deteção do potencial de sensibilização cutânea do tipo de substância em causa. Para que seja considerada adequada, uma substância de referência deve possuir as seguintes propriedades:

— semelhança estrutural e funcional com a classe de substâncias em estudo;

— características físico-químicas conhecidas;

— dados corroborantes do método LLNA: BrdU-ELISA;

— dados corroborantes de outros modelos animais e/ou de ensaios em pessoas.

PROCEDIMENTO DE ENSAIO

Número de animais e níveis de dosagem

17. Utilizam-se, no mínimo, quatro animais por grupo de dosagem e um mínimo de três concentrações da substância em estudo, além de um grupo de controlo negativo em paralelo, tratado apenas com o excipiente da substância em estudo, e de um grupo de controlo positivo (ensaiado em paralelo ou recentemente, consoante a política do laboratório acerca dos pontos 11 a 15). Deve ponderar-se o ensaio de várias doses do produto químico de controlo positivo, sobretudo quando este for ensaiado com intermitência. Os animais dos grupos de controlo devem ser manuseados e tratados de modo idêntico ao dos animais dos grupos tratados, exceto no que respeita à administração da substância em estudo.

18. A escolha da dosagem e do excipiente deve basear-se nas recomendações das referências (2) e (19). Selecionam-se normalmente as doses consecutivas numa série de concentrações adequada, por exemplo, 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 %, etc. A seleção das séries de concentração utilizadas deve ter fundamentação científica. Na escolha de três concentrações consecutivas de modo que a concentração mais elevada maximize a exposição, evitando ao mesmo tempo a ocorrência de toxicidade sistémica e irritação cutânea local excessiva, devem ser tidas em conta as informações toxicológicas (por exemplo, referentes a toxicidade aguda e irritação dérmica), bem como estruturais e físico-químicas, disponíveis sobre a substância em estudo (e/ou sobre substâncias estruturalmente afins) (19) (referência 20 e capítulo B.4 do presente anexo). Na ausência de tais informações, pode ser necessário um ensaio exploratório prévio (ver os pontos 21 a 24).

19. O excipiente não deve interferir no resultado do ensaio nem distorcê-lo, devendo ser escolhido de modo a maximizar a solubilidade e a obter a maior concentração possível numa solução ou suspensão adequada para aplicação da substância em estudo. Constituem excipientes adequados uma mistura de acetona e azeite na proporção volúmica 4:1, a *N,N*-dimetilformamida, a metiletilcetona, o propilenoglicol e o sulfóxido dimetílico (6), mas podem utilizar-se outros, desde que com fundamentação científica. Em certas situações, pode ser necessário efetuar um controlo adicional com um solvente utilizado na prática clínica ou a formulação na qual a substância em estudo é comercializada. Deve ter-se especial cuidado em assegurar que as substâncias hidrófilas sejam incorporadas num sistema (excipiente) que molhe a pele e não escorra de imediato, acrescentando solubilizadores adequados (por exemplo, Pluronic® L92 a 1 %). Devem, portanto, evitar-se os excipientes totalmente aquosos.

▼M3

20. A utilização de gânglios linfáticos de ratos distintos possibilita a avaliação da variabilidade de animal para animal e a comparação estatística da diferença entre as medições relativas à substância em estudo e ao grupo de controlo do excipiente (ver o ponto 33). Por outro lado, só pode ponderar-se a redução do número de ratos no grupo de controlo positivo se forem obtidos dados por animal (17). Além disso, algumas autoridades reguladoras exigem a apresentação de dados por animal. A recolha regular de dados por animal é vantajosa segundo critérios de bem-estar animal, evitando a duplicação de ensaios que seria necessária se os resultados relativos à substância em estudo anteriormente recolhidos de outro modo (por exemplo, agregação de dados relativa a séries de animais) tivessem de ser examinados ulteriormente por autoridades reguladoras com outras exigências (por exemplo, dados individualizados por animal).

Ensaio exploratório prévio

21. Na ausência de informações que permitam determinar a dosagem máxima a ensaiar (ver o ponto 18), é necessário efetuar um ensaio exploratório prévio, a fim de definir a dosagem adequada a ensaiar pelo método LLNA: BrdU-ELISA. O objetivo deste ensaio exploratório consiste em fornecer orientações para a escolha da dosagem máxima a utilizar no estudo principal pelo método LLNA: BrdU-ELISA, caso não se disponha de informações sobre a concentração que induz toxicidade sistémica (ver o ponto 24) e/ou irritação cutânea local excessiva (ver o ponto 23). A dosagem máxima estudada deve ser uma concentração de 100 % da substância em estudo, no caso dos líquidos, ou a concentração máxima possível, no caso dos sólidos e das suspensões.

22. O ensaio exploratório prévio é efetuado em condições idênticas às do estudo principal pelo método LLNA: BrdU-ELISA, mas não se avalia a proliferação nos gânglios linfáticos e podem utilizar-se menos animais por grupo de dosagem. Sugere-se o recurso a um ou dois animais por grupo de dosagem. Observam-se diariamente todos os ratos para verificar se apresentam sinais clínicos de toxicidade sistémica ou de irritação no local de aplicação. Regista-se o peso corporal de cada rato antes do ensaio e antes de o eutanasiar (dia 6). Observam-se as orelhas para verificar se têm eritema e atribui-se-lhes uma pontuação de acordo com o quadro 1 (20 e capítulo B.4 do presente anexo). Mede-se a espessura das orelhas com um instrumento adequado – por exemplo, um micrómetro digital ou um leitor de espessuras da Peacock – no dia 1 (antes da primeira dose), no dia 3 (cerca de 48 horas após a primeira dose) e no dia 6. Complementarmente, no dia 6 pode determinar-se a espessura das orelhas por pesagem de punções auriculares efetuadas depois da eutanásia dos animais. Uma pontuação de eritema ≥ 3 e/ou o aumento da espessura auricular em 25 % ou mais em qualquer dia de medição constituem indicadores de irritação local excessiva (21) (22). Para dosagem mais elevada no estudo principal pelo método LLNA: BrdU-ELISA, deve ser escolhida a dosagem da série de concentrações do ensaio exploratório prévio (ver o ponto 18) imediatamente inferior à que induz toxicidade sistémica e/ou irritação cutânea local excessiva.

Quadro 1

Pontuações de eritema

Observação	Pontuação
Ausência de eritema	0
Eritema muito ligeiro (quase impercetível)	1
Eritema bem definido	2

▼M3

Observação	Pontuação
Eritema moderado a intenso	3
Eritema intensa (vermelhidão roxa) ou formação de escara que impede a pontuação do eritema	4

23. Além do referido acerca do aumento de 25 % da espessura auricular (21) (22), também se recorreu a aumentos estatisticamente significativos da espessura auricular dos ratos tratados, comparativamente aos ratos de controlo, para identificar produtos irritantes pelo método LLNA (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28). Os aumentos estatisticamente significativos da espessura auricular inferiores a 25 % não foram, porém, especificamente associados a irritação excessiva (25) (26) (27) (28) (29).

24. Quando efetuadas no âmbito de uma avaliação integrada, as seguintes observações clínicas podem indiciar toxicidade sistémica (30), podendo assim indicar a dosagem máxima a utilizar no método LLNA: BrdU-ELISA principal: alterações do funcionamento do sistema nervoso (por exemplo, piloereção, ataxia, tremores e convulsões); alterações comportamentais (por exemplo, agressividade, alterações das atividades higiénicas, alterações pronunciadas de atividade); alterações respiratórias (alterações da frequência e da intensidade da respiração, como dispneia, arfar e pieira) e da ingestão de alimentos e de água. Devem ainda ser tidos em conta na avaliação os sinais de letargia e/ou de apatia e quaisquer sinais clínicos de dor ou sofrimento mais do que ligeiros ou momentâneos ou reduções de peso corporal superiores a 5 % entre o dia 1 e o dia 6, bem como a mortalidade. Os animais moribundos e os animais que manifestem grande sofrimento ou sinais de dor intensa devem ser eutanasiados (31).

Sequência experimental do estudo principal

25. A sequência experimental do ensaio é a seguinte:

— *Dia 1:* Identificar individualmente e anotar o peso de cada animal e todas as observações clínicas. Aplicar no dorso de cada orelha 25 µl da diluição adequada da substância em estudo, do excipiente sozinho ou do produto químico de controlo positivo (ensaiado em paralelo ou recentemente, consoante a política do laboratório acerca dos pontos 11 a 15).

— *Dias 2 e 3:* Repetir o procedimento de aplicação efetuado no dia 1.

— *Dia 4:* Nenhum tratamento.

— *Dia 5:* Injetar intraperitonealmente 0,5 ml (5 mg/rato) de solução de bromodesoxiuridina (10 mg/ml).

— *Dia 6:* Anotar o peso de cada animal e todas as observações clínicas. Eutanasiar os animais 24 horas, aproximadamente, após a injeção de bromodesoxiuridina. Excisar os gânglios linfáticos auriculares de drenagem, das orelhas de cada rato, e colocá-los em solução-tampão de fosfato (PBS), separadamente para cada animal. Para pormenores e esquemas da identificação e dissecação dos gânglios linfáticos, ver a referência (17). A fim de melhor avaliar a resposta cutânea local no estudo principal, podem ser incluídos no protocolo de estudo parâmetros suplementares como a pontuação do eritema auricular ou medições da espessura auricular (com um medidor de espessura ou por pesagem de punções auriculares *post mortem*).

▼M3

Preparação das suspensões celulares

26. Preparar suspensões unicelulares de células dos gânglios linfáticos de cada rato, excisados bilateralmente, por desagregação mecânica suave através de um peneiro de aço inoxidável com malha de 200 μm ou recorrendo a outra técnica aceitável para obtenção de suspensões unicelulares (por exemplo, utilizando um almofariz de plástico descartável para esmagar os gânglios linfáticos, seguindo-se a passagem através de um peneiro de *nylon* com malha de 70 μm). O processo de preparação da suspensão de células de gânglios linfáticos é um aspeto crítico deste ensaio, pelo que os operadores devem adestrar-se previamente. Os gânglios linfáticos dos animais de controlo negativo são pequenos, pelo que é necessário proceder com cuidado para evitar efeitos artificiais nos valores do índice de estimulação. O volume da suspensão de células de gânglios linfáticos deve ser o volume ótimo determinado para cada caso (aproximadamente 15 ml). O volume ótimo é o que permite obter uma absorvância média do grupo de controlo negativo compreendida entre 0,1 e 0,2.

Determinação da proliferação celular (medição do teor de bromodesoxiuridina do ADN dos linfócitos)

27. Determina-se o teor de bromodesoxiuridina pelo método ELISA com um conjunto comercial (por exemplo, o n.º de catálogo 11 647 229 001 da Roche Applied Science, Mannheim, Alemanha). Adicionar rapidamente, em triplicado, 100 μl da suspensão de células de gânglios linfáticos a uma placa de microtitulação com alvéolos de fundo plano. Depois da fixação e da desnaturação das células, adicionar anticorpos anti-BrdU a cada alvéolo e deixar reagir. A seguir, remover por lavagem os anticorpos anti-BrdU e adicionar a solução do substrato, deixando formar-se o cromogénio. Medir a absorvância a 370 nm, utilizando como referência o comprimento de onda de 492 nm. As condições experimentais do ensaio devem ser sempre otimizadas (ver o ponto 26).

OBSERVAÇÕES

Observações clínicas

28. Observar cuidadosamente cada rato pelo menos uma vez por dia, com vista à deteção de sinais clínicos, quer de irritação local no ponto de aplicação, quer de toxicidade sistémica. Anotar todas as observações, mantendo um registo para cada rato. Os planos de controlo devem incluir critérios para identificar prontamente os ratos que evidenciem níveis de toxicidade sistémica, irritação cutânea local excessiva ou corrosão da pele passíveis de justificarem a eutanásia do animal (31)

Pesos corporais

29. Tal como referido no ponto 25, mede-se o peso corporal de cada animal no início do ensaio e quando da eutanásia programada.

CÁLCULO DOS RESULTADOS

30. Os resultados correspondentes a cada grupo de tratamento exprimem-se em índice de estimulação (IE) médio. Determina-se o índice de estimulação dividindo o valor médio do índice de marcação com bromodesoxiuridina/ /rato, correspondente a cada grupo tratado com a substância em estudo e ao grupo de controlo positivo, pelo valor médio do índice de marcação com bromodesoxiuridina do grupo de controlo do solvente/excipiente. O índice de estimulação médio para o grupo de controlo tratado com o excipiente é igual a 1.

O índice de marcação com bromodesoxiuridina é definido do seguinte modo:

$$\text{Índice de marcação com bromodesoxiuridina} = (ABS_{em} - ABS\ branco_{em}) - (ABS_{ref} - ABS\ branco_{ref})$$

em que: em = comprimento de onda emitido; ref = comprimento de onda de referência.

▼M3

31. Para efeitos de decisão, consideram-se positivos os resultados de índice de estimulação ≥ 1,6 (10). Todavia, ao ponderar se um resultado próximo do limite (índice de estimulação compreendido entre 1,6 e 1,9) deve ou não ser considerado positivo, podem ter-se também em conta o grau de resposta à dosagem, a significância estatística e a coerência das respostas correspondentes ao solvente/excipiente e à substância de controlo positivo (3) (6) (32).

32. No caso das respostas positivas próximas do limite, com índice de estimulação compreendido entre 1,6 e 1,9, pode ser útil aos utilizadores terem em conta, juntamente com os valores de índice de estimulação, informações adicionais como a resposta à dosagem, sinais de toxicidade sistémica ou de irritação excessiva e, se for caso disso, a significância estatística, para confirmar se os resultados obtidos são positivos (10). Devem examinar-se também as propriedades da substância em estudo, nomeadamente se esta possui estrutura semelhante a sensibilizantes cutâneos conhecidos ou causa irritação cutânea excessiva nos ratos, bem como a natureza da resposta à dosagem observada. Na referência (4) analisam-se em pormenor estes e outros aspetos.

33. A recolha de dados para cada rato possibilita uma análise estatística da existência, nos dados, de indicações de resposta à dosagem e do grau desta resposta. A avaliação estatística pode incluir uma avaliação da resposta à dosagem e comparações, convenientemente adaptadas, de grupos estudados (por exemplo, comparações par a par de um grupo correspondente a uma determinada dosagem com o grupo de controlo tratado com o solvente/excipiente ensaiado em paralelo). As análises estatísticas podem incluir, por exemplo, regressões lineares ou testes de William, para analisar tendências de resposta à dosagem, e testes de Dunnett, para comparações par a par. Na escolha de um método de análise estatística apropriado, o investigador deve estar atento a possíveis divergências das variâncias e a outros problemas conexos passíveis de exigirem uma transformação dos dados ou uma análise estatística não paramétrica. O investigador pode ainda ter de efetuar os cálculos de índice de estimulação e as análises estatísticas considerando alguns pontos e descartar outros (por vezes denominados «aberrantes»).

DADOS E RELATÓRIOS

Dados

34. Os dados devem ser resumidos em quadros, indicando os valores de índice de marcação com bromodesoxiuridina correspondentes a cada animal, a média do índice de marcação com bromodesoxiuridina/animal do grupo, o parâmetro estatístico associado (desvio-padrão ou erro-padrão da média, por exemplo) e o índice de estimulação médio para cada grupo de dosagem, comparativamente ao grupo de controlo do solvente/excipiente ensaiado em paralelo.

Relatório do ensaio

35. O relatório do ensaio deve incluir as seguintes informações:

Produtos químicos em estudo e de controlo:

— dados de identificação (por exemplo, números CAS e CE – caso existam –, origem, grau de pureza, impurezas conhecidas, número de lote),

— natureza física e propriedades físico-químicas (por exemplo, volatilidade, estabilidade, solubilidade),

— no caso de misturas, composição e percentagens relativas dos componentes;

Solvente/excipiente:

— dados de identificação (grau de pureza, concentração – se adequado –, volume utilizado),

— justificação da escolha do excipiente;

▼M3

Animais utilizados nos ensaios:

— origem dos ratos CBA,

— estado microbiológico dos animais, caso seja conhecido,

— número e idade dos animais,

— origem dos animais, condições de alojamento, dieta, etc.;

Condições de ensaio:

— origem, número de lote e dados de garantia de qualidade/controlo de qualidade do fabricante (sensibilidade e especificidade dos anticorpos e limite de deteção) para o conjunto ELISA,

— elementos sobre a preparação e aplicação da substância em estudo,

— justificação das dosagens escolhidas, incluindo os resultados do ensaio exploratório prévio, caso tenha sido efetuado,

— concentrações do excipiente e da substância em estudo utilizadas e quantidade total desta aplicada,

— elementos sobre a qualidade dos alimentos e da água (incluindo o tipo de dieta e a origem desta, bem como a origem da água),

— elementos sobre a organização cronológica dos tratamentos e da colheita das amostras,

— métodos de medição da toxicidade,

— critérios definidos para que o estudo seja considerado positivo ou negativo,

— elementos sobre eventuais desvios ao protocolo e explicação do modo como estes afetam a realização e os resultados do estudo;

Verificação da fiabilidade:

— resumo dos resultados da última verificação de fiabilidade, incluindo informações sobre a substância em estudo, a concentração e o excipiente utilizados,

— dados do laboratório relativos a controlos positivos ensaiados em paralelo e/ou históricos e a controlos negativos (solvente/excipiente) ensaiados em paralelo,

— se não tiver sido efetuado em paralelo um controlo positivo, a data do controlo positivo periódico mais recente e o relatório laboratorial correspondente, bem como um relatório que especifique os dados históricos de controlos positivos do laboratório nos quais se baseou a decisão de não efetuar um controlo positivo em paralelo;

Resultados:

— peso de cada rato no início da dosagem e na altura da sua eutanásia programada, bem como a média e o parâmetro estatístico associado (desvio-padrão ou erro-padrão da média, por exemplo) para cada grupo de tratamento,

— surgimento e evolução de sinais de toxicidade, incluindo irritação dérmica no local da aplicação (caso ocorra), para cada animal,

— quadro de valores de índices de marcação com bromodesoxiuridina e de índices de estimulação para cada grupo de tratamento, por rato,

— média e parâmetro estatístico associado (desvio-padrão ou erro-padrão da média, por exemplo) do índice de marcação com bromodesoxiuridina/rato, para cada grupo de tratamento, e resultados da análise dos pontos aberrantes, também para cada grupo de tratamento,

▼M3

— índice de estimulação calculado e medida adequada da variabilidade de animal para animal, relativamente à substância em estudo e nos grupos de controlo,

— resposta à dosagem,

— análises estatísticas que se justifiquem;

Análise dos resultados:

— comentário breve sobre os resultados obtidos; análise da resposta à dosagem, análises estatísticas que se justifiquem e conclusão sobre a classificação, ou não, da substância em estudo como sensibilizante cutânea.

REFERÊNCIAS

(1) OCDE (2010). Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay. Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals. OCDE, Paris. Disponível em: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(2) Chamberlain, M., Basketter, D.A. (1996). The local lymph node assay: status of validation. *Food Chem. Toxicol.*, 34, 999-1002.

(3) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I., Loveless, S.E. (1996). The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.*, 34, 985-997.

(4) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. (1998). Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.*, 36, 327-33.

(5) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J., Van Loveren, H. (2000). A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. *Toxicol.*, 146, 49-59.

(6) ICCVAM (1999). The murine local lymph node assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Disponível em: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf].

(7) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001). ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34(3), 258-273.

(8) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001). ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34(3), 274-286.

(9) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001). ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34(3), 249-257.

(10) ICCVAM (2010). ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: BrdU-ELISA Test Method Protocol (LLNA: BrdU-ELISA). NIH Publication No. 10-7552A/B. Research Triangle Park, NC. National Institute of Environmental Health Sciences. Disponível em: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-ELISA/TMER.htm].

▼**M3**

(11) ICCVAM (2009). Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC. National Institute of Environmental Health Sciences. Disponível em: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPRept2009.pdf].

(12) Takeyoshi, M., Iida, K., Shiraishi, K., Hoshuyama, S. (2005). Novel approach for classifying chemicals according to skin sensitising potency by non-radioisotopic modification of the local lymph node assay. *J. Appl. Toxicol.*, 25, 129-134.

(13) OCDE (1992), Skin Sensitisation. Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals. OCDE, Paris. Disponível em: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(14) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C., Wendel, A. (2008). Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). *Food Chem. Toxicol.*, 46, 1896-1904.

(15) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R., Mehling, A. (2009). Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 55, 90-96.

(16) ILAR (1996). Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 7.ª edição. Washington, DC. National Academies Press.

(17) ICCVAM (2009). Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay. NIH Publication Number 09-7357. Research Triangle Park, NC. National Institute of Environmental Health Sciences. Disponível em:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf].

(18) McGarry, H.F. (2007). The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. *Toxicol.*, 238, 71-89.

(19) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W., Basketter, D.A. (1994). The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicol.*, 93, 13-31.

(20) OCDE (2002). Acute Dermal Irritation/Corrosion. Test Guideline No. 404, Guidelines for Testing of Chemicals. OCDE, Paris. Disponível em: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(21) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L., DeGeorge, G.L. (2007). Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. *Toxicologist*, 96, 235.

(22) ICCVAM (2009), Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC. National Institute of Environmental Health Sciences. Disponível em: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf].

(23) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S., Meade, B.J. (1998). Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. *Drug Chem. Toxicol.*, 21, 195-206.

(24) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P., Vohr, V.W. (1998). An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 153, 83-94.

(25) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B., Meade, B.J. (1998). A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. *Toxicol. Meth.*, 8, 245-256.

▼**M3**

(26) Hayes, B.B., Meade, B.J. (1999). Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. *Drug. Chem. Toxicol.*, 22, 491-506.

(27) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R., Vohr, H.W. (2005). A European inter- laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol.*, 212, 60-68.

(28) Vohr, H.W., Ahr, H.J. (2005). The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol.*, 79, 721-728.

(29) Patterson, R.M., Noga, E., Germolec D. (2007). Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract. *Environ. Health Perspect.*, 115, 1023--1028.

(30) ICCVAM (2009). Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing *In Vitro* Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC. National Institute of Environmental Health Sciences. Disponível em: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm].

(31) OCDE (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7. OCDE, Paris. Disponível em: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(32) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E., Hastings, K.L. (1998). Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. *J. Toxicol. Environ. Health*, 53, 563-79.

(33) OCDE (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14. OCDE, Paris. Disponível em: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

▼**M3**

Apêndice 1

DEFINIÇÕES

Exatidão: Grau de acordo entre os resultados do método de ensaio e os valores de referência aceites. Constitui uma medida do desempenho do método e um dos aspetos da adequação. Este termo e o termo «concordância» são muitas vezes utilizados indistintamente para indicar a proporção de resultados corretos de um método de ensaio (33).

Substância de referência: Substância (sensibilizante ou não) utilizada como termo de comparação com a substância em estudo. Deve ter as seguintes propriedades: i) origem ou origens uniformes e fiáveis; ii) similaridade estrutural e funcional com a classe de substâncias em estudo; iii) características físico-químicas conhecidas; iv) disponibilidade de dados sobre os efeitos conhecidos; e v) potência conhecida situada na gama de reação pretendida.

Falso negativo: Substância incorretamente considerada negativa ou inativa pelo método de ensaio, quando na realidade é positiva ou ativa (33).

Falso positivo: Substância incorretamente considerada positiva ou ativa pelo método de ensaio, quando na realidade é negativa ou inativa (33).

Perigo: Potencial de efeitos adversos na saúde ou no ambiente, que só se manifestam se o grau de exposição for suficiente.

Reprodutibilidade interlaboratorial: Medida do grau em que laboratórios qualificados diferentes, utilizando o mesmo protocolo para ensaiar a mesma substância em estudo, conseguem obter resultados qualitativa e quantitativamente similares. Determina-se durante os processos de pré-validação e de validação. Indica em que medida um ensaio pode ser transferido com êxito para outro laboratório e também se designa por «reprodutibilidade entre laboratórios» (33).

Reprodutibilidade intralaboratorial: Medida do grau em que pessoal qualificado do mesmo laboratório nele consegue repetir resultados com êxito, em momentos diferentes, utilizando o mesmo protocolo. Também se designa por «reprodutibilidade no laboratório» (33).

Ponto aberrante: Observação que difere marcadamente dos outros valores de uma amostra aleatória de uma população.

Garantia de qualidade: Processo de gestão no âmbito do qual a observância das normas de ensaio, das exigências e dos procedimentos de conservação de registos laboratoriais, bem como a exatidão dos dados transferidos, são avaliadas por pessoas independentes das que efetuam os ensaios.

Fiabilidade: Medida em que, utilizando o mesmo protocolo, um método de ensaio pode ser continuadamente reproduzido no mesmo laboratório e em laboratórios diferentes. A fiabilidade é avaliada com base nos valores calculados das reprodutibilidades intralaboratorial e interlaboratorial (33).

Sensibilização cutânea: Processo imunológico que se manifesta quando um indivíduo sensível é exposto, por via tópica, a um alergénio químico indutor de uma resposta imunológica cutânea passível de gerar sensibilização por contacto.

Índice de estimulação (IE): Valor calculado para quantificar o potencial de sensibilização cutânea das substâncias estudadas; corresponde à razão entre a proliferação nos grupos tratados e a proliferação no grupo de controlo do excipiente ensaiado em paralelo.

Substância em estudo (ou produto químico em estudo): Qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado o presente método de ensaio.

▼M4

B.52. TOXICIDADE AGUDA POR INALAÇÃO — MÉTODO DE CLASSIFICAÇÃO DE TOXICIDADE AGUDA

INTRODUÇÃO

1. Este método é equivalente ao *Test Guideline* 436 (2009) da OCDE. O primeiro método relativo à toxicidade aguda por inalação (*Test Guideline* TG 403) foi adotado em 1981 e posteriormente revisto — ver o capítulo B.2 (1) deste anexo. Depois da adoção de uma revisão do Método de Classificação de Toxicidade Aguda — capítulo B.1.tris deste anexo (5) —, justificava-se dispor de um método de classificação de toxicidade aguda por inalação (2)(3)(4). Uma avaliação retrospetiva deste método de classificação de toxicidade aguda por inalação revelou que o mesmo se adequa à utilização para efeitos de classificação e rotulagem (6). Neste método sequencial recorre-se a séries de concentrações visadas fixas para classificar a toxicidade de produtos químicos. Embora o parâmetro fundamental seja a letalidade, os animais que apresentem sinais de dor intensa, de grande aflição, em sofrimento ou moribundos devem ser eutanasiados, para lhes minimizar o sofrimento. O *Guidance Document* n.º 19 da OCDE (7) contêm orientações sobre os parâmetros eticamente mensuráveis.

2. O *Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing* (GD 39) (8) contém orientações para a realização e interpretação deste método de ensaio.

3. No apêndice 1 e no referido GD 39 (8) definem-se alguns conceitos utilizados neste método.

4. Este método permite obter informações sobre as propriedades perigosas e possibilita o escalonamento e a classificação de acordo com o Regulamento (CE) n.º 1272/2008 de produtos químicos causadores de toxicidade aguda (9). Caso sejam necessárias estimativas numéricas de valores de CL_{50} ou análises da resposta à concentração, o método adequado a utilizar é o descrito no capítulo B.2 (1) este anexo. Para mais orientações sobre a escolha do método de ensaio, consultar o documento GD 39 (8). Este método não se destina especificamente ao ensaio de materiais especiais, tais como matérias fibrosas ou isométricas pouco solúveis ou nanomateriais manufaturados.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

5. Antes de proceder a ensaios segundo este método, o laboratório deve ter em conta os elementos disponíveis sobre o produto químico, nomeadamente estudos já efetuados cujos resultados eventualmente dispensem a realização de mais ensaios, a fim de minimizar a utilização de animais. Entre os elementos úteis para a escolha da espécie, da estirpe, do sexo, do modo de exposição e das concentrações mais adequados contam-se a identidade, a estrutura química e as propriedades físico-químicas do produto químico em estudo, resultados de ensaios de toxicidade *in vitro* ou *in vivo*, as utilizações previstas, o potencial de exposição humana e dados (Q)SAR — "(*quantitative) structure-activity relationships*", relações (quantitativas) estrutura/atividade — e toxicológicos disponíveis sobre produtos químicos estruturalmente afins. Não deve ensaiar-se por este método concentrações que presumivelmente causarão dor ou sofrimento intensos, devido a efeitos corrosivos [1] ou fortemente irritantes [ver o GD 39 (8)].

[1] A avaliação da corrosividade pode basear-se na apreciação de especialistas na matéria, tendo designadamente em conta elementos relativos a experiências em pessoas ou animais, dados *in vitro* disponíveis — por exemplo, provenientes dos capítulos B.40 (10) ou B.40.A (11) deste anexo ou do *Test Guideline 425* da OCDE (12) —, valores de pH, informações relativas a produtos químicos similares ou outros dados pertinentes.

▼M4

PRINCÍPIO DO MÉTODO

6. Com base num processo sequencial, obtêm-se informações sobre a toxicidade aguda do produto químico em estudo por inalação durante um período de exposição de quatro horas que são suficientes para o classificar. Por razões ligadas à regulamentação aplicável, a duração da exposição pode ser diferente. São ensaiados três animais de cada sexo em cada uma das etapas de concentração definidas. Consoante a mortalidade e/ou o número de animais moribundos, podem bastar duas etapas para ajuizar da toxicidade aguda do produto químico em estudo. Caso se verifique que um dos sexos é mais sensível do que o outro, pode prosseguir-se o ensaio apenas com o sexo mais sensível. O resultado de uma etapa determina o que fazer a seguir:

   a) Não são necessários mais ensaios;

   b) Ensaia-se três animais de cada sexo; ou

   c) Ensaia-se seis animais apenas do sexo mais sensível — a estimativa do limite inferior da classe de toxicidade deve basear-se no ensaio de seis animais (independentemente do sexo) por grupo de concentração em estudo.

7. Os animais moribundos ou que apresentem sinais óbvios de dor ou de grande sofrimento continuado devem ser eutanasiados e, na interpretação dos resultados do ensaio, ser considerados do mesmo modo que os animais que morrem no ensaio. O documento de orientações n.º 19, relativo aos parâmetros eticamente mensuráveis (7), define os critérios que devem presidir à decisão de eutanasiar animais moribundos ou em grande sofrimento, bem como orientações sobre o reconhecimento da morte previsível ou iminente.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Escolha da espécie animal

8. Devem ser utilizados animais adultos, jovens e saudáveis de estirpes laboratoriais correntes. A espécie preferida é o rato. É necessário justificar a utilização de outras espécies.

Preparação dos animais

9. As fêmeas utilizadas devem ser nulíparas e não podem estar grávidas. No dia da exposição, os animais devem ser adultos jovens com oito a 12 semanas, de peso corporal não desviado mais de 20 % do peso médio correspondente a cada sexo dos animais da mesma idade anteriormente expostos. Os animais devem ser selecionados aleatoriamente e marcados para identificação individual. Para aclimatação às condições laboratoriais, devem permanecer nas gaiolas durante, pelo menos, cinco dias antes do início do ensaio. Durante um curto período antes do ensaio, também devem ser aclimatados ao dispositivo de ensaio, para diminuir a tensão causada por um ambiente novo.

Manutenção dos animais

10. A temperatura do biotério deve ser de 22 °C ± 3 °C. O ideal será manter a humidade relativa entre 30 % e 70 %, embora isto possa não ser possível ao utilizar água como veículo. Antes e depois das exposições, os animais são geralmente engaiolados por sexo e por concentração, mas o número de animais por gaiola não deve dificultar a clara observação de cada animal e deve minimizar as perdas devidas a lutas ou canibalismo. Quando se opta pela exposição unicamente nasal dos animais, pode ser necessário aclimatá-los aos tubos de contenção. Estes não devem provocar aos animais tensões físicas, térmicas ou dinâmicas excessivas. A contenção dos animais pode afetar parâmetros fisiológicos como a temperatura corporal (hipertermia) e/ou o volume respirado por minuto. Caso se disponha de dados genéricos

▼M4

reveladores de que nenhuma destas alterações ocorre em grau apreciável, não será necessária a preadaptação aos tubos de contenção. Os animais cujo corpo seja exposto na totalidade a um aerossol devem permanecer em gaiolas individuais durante a exposição, para evitar que o aerossol seja filtrado pela pelagem dos que com eles coabitem. Exceto nos períodos de exposição, podem utilizar-se dietas convencionais certificadas de laboratório, com fornecimento ilimitado de água potável da rede pública. A iluminação deve ser artificial, com uma sequência de 12 horas de luz seguidas de 12 horas de escuridão.

Câmaras de inalação

11. Ao escolher-se a câmara de inalação, deve ter-se em conta a natureza do produto químico em estudo e o objetivo do ensaio. Privilegia-se o modo de exposição unicamente nasal, termo que abrange as exposições "unicamente da cabeça", "unicamente do nariz" e "unicamente do focinho". A exposição unicamente nasal é geralmente preferida no estudo de aerossóis de líquidos ou de sólidos, ou de vapores que possam condensar-se e formar aerossóis. Para determinados objetivos do estudo, poderá ser melhor recorrer ao modo de exposição de corpo inteiro, mas será necessário justificá-lo no relatório. Para garantir estabilidade atmosférica nas câmaras de corpo inteiro, o volume de todos os animais presentes em cada câmara não deve exceder 5 % do volume da câmara. O documento GD 39 (8) descreve os princípios, vantagens e desvantagens das técnicas de exposição unicamente nasal e de corpo inteiro.

CONDIÇÕES DE EXPOSIÇÃO

Administração das concentrações

12. Recomenda-se que a exposição tenha uma duração fixa de quatro horas, excluído o tempo para se estabelecer o equilíbrio. Em determinadas circunstâncias, podem ser necessários outros tempos de exposição, havendo que justificá-lo no relatório do estudo [ver o GD 39 (8)]. Os animais expostos em câmaras de corpo inteiro devem ser alojados individualmente, para evitar que animais coabitantes ingiram o produto químico em estudo ao lamberem-se uns aos outros. Durante o período de exposição, a alimentação deve ser suspensa. Durante as exposições de corpo inteiro pode continuar a fornecer-se água.

13. Os animais são expostos ao produto químico em estudo sob a forma de gás, vapor, aerossol ou de uma mistura destes. O estado físico a ensaiar depende das propriedades físico-químicas do produto químico em estudo, da concentração escolhida e/ou da forma física cuja probabilidade de presença durante a manipulação e utilização do mesmo seja maior. Os produtos químicos higroscópicos ou quimicamente reativos devem ser ensaiados em atmosfera seca. Deve tomar-se precauções para evitar concentrações que possam provocar explosões.

Distribuição granulométrica

14. Os aerossóis e os vapores que possam condensar-se em aerossóis devem ser objeto de análise granulométrica. Para que todas as zonas pertinentes do aparelho respiratório sejam expostas, recomenda-se a utilização de aerossóis com diâmetro aerodinâmico mediano da massa (MMAD) compreendido entre 1 μm e 4 μm e desvio-padrão geométrico (σ_g) compreendido entre 1,5 e 3,0 (8)(13)(14). Deve fazer-se o razoavelmente possível para respeitar estas condições, sendo necessário um parecer especializado caso isso não se consiga. Por exemplo, as partículas dos fumos metálicos podem ser mais pequenas do que o limite inferior indicado e as partículas carregadas, as fibras e as matérias higroscópicas (que aumentam de volume no ambiente húmido do aparelho respiratório) podem exceder o limite superior.

▼M4

Incorporação do produto químico em estudo num veículo

15. Pode utilizar-se um veículo para obter a concentração e a granulometria adequadas do produto químico na atmosfera. Regra geral, deve preferir-se a água. As matérias em partículas podem ser sujeitas a processos mecânicos destinados a obter a distribuição granulométrica necessária, mas tendo o cuidado de não decompor nem alterar o produto químico em estudo. Quando houver indícios de que um processo mecânico possa ter alterado a composição do produto químico em estudo (por exemplo, devido às altas temperaturas geradas pela fricção numa moagem excessiva), será necessário verificá-la por meios analíticos. Devem tomar-se as precauções adequadas para não contaminar o produto químico em estudo. Não é necessário ensaiar matérias granulosas não friáveis intencionalmente formuladas para não serem inaláveis. Para demonstrar que a manipulação de uma matéria granulosa não gera partículas respiráveis, efetua-se um ensaio de desgaste. Se este gerar partículas respiráveis, deve realizar-se um ensaio de toxicidade por inalação.

Animais de controlo

16. Não é necessário um grupo de controlo negativo (do ar) em paralelo. Caso se utilize um veículo diverso da água para gerar a atmosfera a ensaiar, só se utilizará um grupo de controlo do veículo se não se dispuser de dados históricos de toxicidade por inalação. Se um estudo de toxicidade de um produto químico incorporado num determinado veículo não revelar toxicidade, conclui-se que o veículo em causa não é tóxico à concentração ensaiada, não sendo necessário nenhum grupo de controlo do veículo.

MONITORIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXPOSIÇÃO

Caudal de ar nas câmaras

17. Durante cada exposição, é necessário regular cuidadosamente, monitorizar continuamente e registar pelo menos de hora a hora o caudal de ar através de cada câmara. A monitorização da concentração (ou estabilidade) da atmosfera em estudo constitui uma medida permanente de todos os parâmetros dinâmicos e um meio indireto de regular os que intervêm na geração da atmosfera em estudo. É necessário ter especial cuidado em evitar reinalações nas câmaras de exposição unicamente nasal, evitando que o fluxo de ar através do sistema de exposição seja incapaz de produzir uma circulação dinâmica da atmosfera que contém o produto químico em estudo. Existem metodologias a que pode recorrer-se para demonstrar que não ocorrem reinalações nas condições experimentais escolhidas (8)(15). A concentração de oxigénio não deve ser inferior a 19 % e a concentração de dióxido de carbono não deve exceder 1 %. Se houver razões para crer que estas concentrações não são respeitadas, é necessário medi-las.

Temperatura e humidade relativa nas câmaras

18. Deve manter-se a temperatura nas câmaras a 22 °C ± 3 °C. Tanto no caso das exposições unicamente nasais como das exposições do corpo inteiro, é necessário monitorizar a humidade relativa na zona de respiração dos animais e registá-la pelo menos três vezes (duração do ensaio até quatro horas) ou de hora a hora (durações mais curtas). O ideal seria manter a humidade relativa entre 30 % e 70 %, mas isso pode não ser possível (por exemplo, quando se estudam misturas aquosas) ou pode não ser mensurável (devido a interferências do produto químico em estudo com o método de ensaio).

▼M4

Concentração nominal do produto químico em estudo

19. Sempre que possível, deve calcular-se e registar-se a concentração nominal na câmara de exposição. Esta é dada pela divisão da massa gerada do produto químico em estudo pelo volume de ar total que circulou pela câmara. A concentração nominal não é utilizada para caracterizar a exposição dos animais, mas a sua comparação com a concentração real dá uma indicação da eficácia de geração do sistema de ensaio, podendo ser utilizada para detetar problemas a esse nível.

Concentração real do produto químico em estudo

20. Entende-se por "concentração real do produto químico em estudo", a concentração do produto químico na zona de respiração dos animais da câmara de inalação. As concentrações reais podem determinar-se por métodos específicos (por exemplo, amostragem direta ou métodos de adsorção ou de reação química e posterior caracterização analítica) ou por métodos inespecíficos, tais como gravimetria após filtração. O método gravimétrico só é aceitável para aerossóis de pós com um único componente ou de líquidos pouco voláteis e deve apoiar-se em caracterizações adequadas específicas do produto químico em causa efetuadas antes da realização do estudo. A concentração de aerossóis de pós com vários componentes também pode determinar-se por gravimetria. Todavia, são necessários para isso dados analíticos que demonstrem que a composição do produto transportado no aerossol é semelhante à do produto inicial. Se não se dispuser desses dados, pode ser necessário reanalisar periodicamente o produto químico em estudo (idealmente no aerossol) durante o ensaio. No caso dos agentes aerossolizados que possam evaporar-se ou sublimar, é necessário demonstrar que todas as fases são recolhidas pelo método escolhido. As concentrações visadas, nominais e reais devem figurar no relatório do estudo, mas apenas as concentrações reais são utilizadas na análise estatística para cálculo dos valores letais de concentração.

21. Deve utilizar-se, se possível, apenas um lote do produto químico em estudo e a amostra em estudo deve ser conservada em condições que preservem a sua pureza, homogeneidade e estabilidade. Antes de iniciar o estudo, deve caracterizar-se o produto químico em causa no que respeita à sua pureza e, se tecnicamente viável, à sua identidade e às quantidades dos contaminantes e impurezas nele identificados. Para o efeito, pode recorrer-se, entre outros, aos seguintes dados: tempos de retenção e áreas relativas de picos, pesos moleculares obtidos por espetrometria de massa ou cromatografia em fase gasosa ou outras estimativas. Embora a identidade da amostra a estudar não seja da responsabilidade do laboratório, pode ser aconselhável que este confirme, pelo menos, alguns aspetos da caracterização efetuada pelo cliente (cor, natureza física, etc.).

22. Deve manter-se a atmosfera de exposição tão constante quanto possível e proceder-se à sua monitorização continuamente e/ou intermitentemente, consoante o método de análise. Caso se proceda a uma colheita de amostras intermitente, num estudo de quatro horas deve recolher-se uma amostra da atmosfera da câmara pelo menos duas vezes. Se isso não for viável, por limitações relacionadas com o caudal de ar ou devido a concentrações baixas, pode colher-se uma amostra ao longo de todo o período de exposição. Se ocorrerem variações pronunciadas de uma amostra para outra, devem colher-se quatro amostras por exposição nas concentrações seguintes. A concentração na câmara correspondente a uma determinada amostra não deve desviar-se da concentração média na câmara mais de 10 %, no caso de gases e vapores, nem mais de 20 %, no caso de aerossóis de líquidos ou de sólidos. Deve calcular-se e registar-se o tempo necessário para a câmara atingir o equilíbrio (t_{95}). A duração da exposição corresponde ao tempo de geração do produto químico em estudo, incluído o tempo necessário para atingir t_{95}. O documento GD 39 (8) contém orientações para a estimativa do t_{95}.

▼M4

23. No caso de misturas muito complexas de vapores ou gases e de aerossóis (por exemplo, atmosferas de combustão e produtos químicos gerados por produtos ou dispositivos finais específicos), o comportamento de cada fase na câmara de inalação pode ser diferente. Por esse motivo, deve escolher-se em cada fase (vapor ou gás e aerossol) pelo menos uma substância indicadora (substância analisada), normalmente a principal substância ativa da mistura. Se o produto químico em estudo for uma mistura, deve indicar-se no relatório a concentração analítica correspondente à mistura e não apenas a concentração correspondente ao ingrediente ativo ou ao componente (substância analisada) em causa. O documento GD 39 (8) contém mais informações sobre as concentrações reais.

Distribuição granulométrica do produto químico em estudo

24. Deve determinar-se a distribuição granulométrica dos aerossóis pelo menos duas vezes durante cada exposição de quatro horas, recorrendo a um impactor de cascata ou a outro instrumento, tal como um granulómetro aerodinâmico. Se for possível demonstrar a equivalência dos resultados obtidos pelo impactor de cascata e pelo instrumento alternativo, pode utilizar-se este último em todo o estudo. Em paralelo ao instrumento primário, deve utilizar-se um segundo dispositivo, tal como um filtro gravimétrico ou um borbulhador de gás/impactor *impinger*, para confirmar a eficiência de captação do primeiro. As concentrações mássicas obtidas por análise granulométrica e por análise com filtros não devem diferir entre si mais do que valores razoáveis [ver o GD 39 (8)]. Se for possível demonstrar esta equivalência no início do estudo, não é necessário efetuar mais medições de confirmação. Por razões de bem-estar animal, devem tomar-se medidas para minimizar dados inconclusivos que possam obrigar à repetição de exposições. É necessário efetuar uma análise granulométrica no caso dos vapores que possam condensar-se para formar aerossóis ou se forem detetadas partículas numa atmosfera de vapores suscetível de formar fases mistas (ver o ponto 14).

PROCEDIMENTO

Ensaio principal

25. Utiliza-se em cada etapa três animais de cada sexo ou seis animais do sexo mais sensível. Se espécies que não o rato forem sujeitas a exposição unicamente nasal, pode ajustar-se a duração máxima da exposição para minimizar a tensão gerada na espécie em causa. Para dose inicial, escolhe-se, das quatro concentrações fixas, a que tenha mais probabilidade de produzir efeitos tóxicos em alguns dos animais expostos. Os esquemas de ensaio para gases, vapores e aerossóis constantes dos apêndices 2 a 4 representam o procedimento a seguir em função dos valores-limite das categorias de classificação, rotulagem e embalagem 1 a 4 estabelecidos (9) para gases (100, 500, 2 500, 20 000 ppm durante 4 h, apêndice 2), vapores (0,5, 2, 10, 20 mg/l durante 4 h, apêndice 3) e aerossóis (0,05, 0,5, 1, 5 mg/l durante 4 h, apêndice 4). A categoria 5, que o Regulamento (CE) n.º 1272/2008 (9) não prevê, aplica-se às concentrações acima do limite correspondente. A cada concentração inicial aplica-se o esquema de ensaio respetivo. O procedimento de ensaio consiste em seguir no fluxograma as setas correspondentes ao número de animais eutanasiados ou que morreram, até ser possível atribuir uma categoria.

26. O intervalo de tempo entre a exposição dos diversos grupos é determinado pelo aparecimento, pela duração e pela intensidade dos sinais de toxicidade observados. Não se expõem animais ao nível de concentração seguinte enquanto não houver um grau razoável de confiança na sobrevivência dos últimos animais expostos. Recomenda-se um período de três ou quatro dias entre a exposição a cada nível de concentração, de modo a permitir a observação de efeitos tóxicos retardados. Se necessário, o intervalo de tempo pode ser ajustado, por exemplo, em caso de respostas inconclusivas.

▼M4

Ensaio do limite

27. Efetua-se este ensaio caso se saiba ou preveja que o produto químico em estudo é praticamente não tóxico, isto é, só induzirá toxicidade acima da concentração-limite prevista na regulamentação aplicável. Podem obter-se informações sobre a toxicidade do produto químico em estudo a partir de ensaios já realizados com substâncias ou misturas semelhantes, tomando em consideração a identidade e percentagem dos componentes de importância toxicológica reconhecida. Nos casos em que se disponha de pouca ou nenhuma informação sobre a toxicidade do produto químico em estudo ou quando este for previsivelmente tóxico, deve efetuar-se o estudo principal — o documento GD 39 (8) contém mais orientações.

28. Seguindo o procedimento normal, constitui ensaio do limite neste método de ensaio expor três animais de cada sexo, ou seis animais do sexo mais sensível, às concentrações de 20 000 ppm (gases), 20 mg/l (vapores) e 5 mg/l (poeiras e nebulizados), se for possível atingi-las. Ao ensaiar aerossóis, o principal objetivo é conseguir obter partículas de dimensões respiráveis (MMAD compreendido entre 1 μm e 4 μm), o que, com a maior parte dos produtos químicos, se consegue a uma concentração de 2 mg/l. Só deve tentar-se ensaiar aerossóis a concentrações superiores a 2 mg/l se for possível gerar partículas de dimensões respiráveis [ver o GD 39 (8)]. Por razões de bem-estar animal, o sistema GHS (16) desaconselha o ensaio de concentrações superiores à concentração-limite. Só importa ponderar a realização de ensaios relativos à categoria 5 do sistema GHS (16), não prevista no Regulamento (CE) n.º 1272/2008 (9), se for elevada a probabilidade de os resultados desses ensaios terem interesse direto para a proteção da saúde humana, o que deve justificar-se no relatório do estudo. No caso de produtos químicos potencialmente explosivos, deve tomar-se precauções para evitar condições favoráveis à ocorrência de explosões. Para evitar a utilização desnecessária de animais, deve efetuar-se um ensaio sem animais antes do ensaio do limite, para verificar se é possível atingir as condições deste ensaio nas câmaras.

EXAMES

29. Os animais devem ser examinados clinicamente com frequência durante o período de exposição. Depois desta, deve efetuar-se um exame clínico pelo menos duas vezes no dia da exposição — ou mais vezes, quando a resposta dos animais à exposição o aconselhar — e pelo menos uma vez por dia em seguida, durante 14 dias. Não é fixada uma duração do período de observação, que deve depender da natureza e do momento do aparecimento de sinais clínicos, assim como da duração do período de recuperação. O momento do aparecimento e do desaparecimento dos sinais de toxicidade é importante, nomeadamente se houver uma certa demora na manifestação desses sinais. Todas as observações devem ser sistematicamente registadas, mantendo registos individuais para cada animal. Os animais moribundos ou que apresentem sinais de dor intensa e/ou de grande sofrimento continuado devem ser eutanasiados, por razões de bem-estar animal. No exame clínico de sinais de toxicidade, não devem confundir-se um mau aspeto inicial e alterações respiratórias passageiras, imputáveis ao procedimento de exposição, com efeitos decorrentes da exposição propriamente dita. Devem ser tidos em conta os princípios e critérios resumidos no documento de orientações relativo aos parâmetros eticamente mensuráveis (7). Se forem eutanasiados animais ou forem encontrados animais mortos, deve registar-se o momento da morte com a maior exatidão possível.

▼M4

30. Os exames a efetuar aos animais engaiolados devem incidir, nomeadamente, nas alterações da pele e da pelagem, dos olhos e das mucosas, do aparelho respiratório, do sistema circulatório, dos sistemas nervosos autónomo e central, da atividade somatomotora e do comportamento. Se possível, registar as diferenças eventualmente observadas entre efeitos locais e sistémicos. Deve estar-se atento a tremores, convulsões, salivação, diarreia, letargia, sono e coma. A medição da temperatura retal pode corroborar uma bradipneia reflexa ou uma hipo/hipertermia relacionadas com a exposição ou com o confinamento.

Peso corporal

31. Regista-se o peso de cada animal uma vez durante o período de aclimatação, no dia da exposição, antes desta (dia 0), e, pelo menos, nos dias 1, 3 e 7 (e posteriormente uma vez por semana), bem como no momento da morte ou da eutanásia, se posterior ao dia 1. O peso corporal é reconhecidamente um indicador crítico de toxicidade, pelo que é necessário observar atentamente os animais cujo peso decresça 20 % ou mais relativamente ao peso anterior ao estudo e não volte a aumentar. No final do período após a exposição, pesa-se e eutanasia-se os animais sobreviventes.

Patologia

32. Os animais utilizados nos ensaios (incluindo os que morrerem durante o ensaio ou que forem eutanasiados e retirados do estudo por razões de bem-estar animal) devem ser sujeitos a uma autópsia macroscópica. Se não for possível realizar a autópsia imediatamente depois de detetada a morte do animal, este deve ser refrigerado (não congelado) a uma temperatura suficientemente baixa para minimizar a autólise. As autópsias devem ser efetuadas o mais rapidamente possível, normalmente não mais de um ou dois dias após a morte. Regista-se todas as alterações patológicas macroscópicas de cada animal, prestando especial atenção às alterações do aparelho respiratório.

33. Pode efetuar-se outros exames previamente previstos para alargar o valor interpretativo do estudo, tais como a pesagem dos pulmões dos ratos sobreviventes e/ou a pesquisa, por exame microscópico, de irritações do aparelho respiratório. Também podem examinar-se os órgãos que evidenciem macropatologias de animais que tenham sobrevivido 24 horas ou mais, bem como órgãos que se saiba serem afetados ou que se preveja serem-no. O exame microscópico de todo o aparelho respiratório pode fornecer elementos úteis no caso dos produtos químicos que reagem com a água, tais como os ácidos e os produtos químicos higroscópicos.

DADOS E RELATÓRIOS

Dados

34. Devem ser indicados o peso corporal e os resultados da autópsia de cada animal. Deve resumir-se os resultados dos exames clínicos num quadro, indicando, para cada grupo estudado, o número de animais utilizados, o número de animais que apresentaram sinais específicos de toxicidade, o número de animais que morreram durante o ensaio ou que foram eutanasiados e o momento da morte de cada animal, complementados por uma descrição dos efeitos tóxicos e da evolução e reversibilidade destes, bem como pelos resultados das autópsias.

▼M4

Relatório dos ensaios

35. Elementos a constar, quando pertinente, do relatório dos ensaios:

Animais estudados e condições em que são mantidos

— descrição das condições de engaiolamento, nomeadamente: número (ou alteração do número) de animais por gaiola, camas, temperatura e humidade relativa ambientes, fotoperíodo e dieta,

— espécie e estirpe utilizadas e, caso não sejam utilizados ratos, justificação da utilização de outra espécie,

— número, idade e sexo,

— método de aleatorização,

— elementos sobre a qualidade dos alimentos e da água (incluindo o tipo de dieta e a origem desta, bem como a origem da água),

— descrição de eventuais condicionamentos anteriores ao ensaio, nomeadamente ao nível da dieta, de quarentenas e do tratamento de doenças.

Produto químico em estudo

— natureza física, grau de pureza e propriedades físico-químicas pertinentes (incluindo a isomerização),

— dados de identificação e, se for conhecido, número de registo CAS (*Chemical Abstract Service*).

Veículo

— justificação da utilização e da escolha do veículo (se não for água),

— dados históricos ou paralelos demonstrativos de que o veículo não interfere nos resultados do estudo.

Câmaras de inalação

— descrição – incluindo dimensões e volume – das câmaras de inalação,

— origem e descrição do equipamento utilizado na exposição dos animais e na geração da atmosfera,

— equipamento de medição da temperatura, humidade, granulometria e concentração real,

— fonte de ar, tratamento do ar fornecido/evacuado e sistema de climatização utilizado,

— métodos utilizados para calibrar o equipamento a fim de garantir a homogeneidade da atmosfera ensaiada,

— subpressão ou sobrepressão,

— pontos de exposição por câmara (de exposição unicamente nasal); localização dos animais no sistema (câmara de exposição de corpo inteiro),

— homogeneidade/estabilidade no tempo da atmosfera ensaiada,

— localização nas câmaras dos sensores térmicos e higrométricos e dos pontos de colheita de amostras da atmosfera ensaiada,

— caudais de ar, caudal de ar em cada ponto de exposição (exposição unicamente nasal) ou relação entre o volume ocupado pelos animais e o volume da câmara (câmara de exposição de corpo inteiro),

— informações sobre o equipamento eventualmente utilizado para medir o oxigénio e o dióxido de carbono,

▼M4

— tempo necessário para as câmaras de inalação atingirem o equilíbrio (t_{95}),

— número horário de substituições de volume,

— medidores (se existirem).

Elementos relativos à exposição

— fundamentação da escolha da concentração visada no estudo principal,

— concentrações nominais (dadas pela divisão da massa do produto químico em estudo introduzido na câmara de inalação pelo volume de ar total que nela circulou),

— concentrações reais do produto químico em estudo obtidas na zona de respiração dos animais; no caso das misturas estudadas que geram formas físicas heterogéneas (gases, vapores, aerossóis), pode analisar-se separadamente cada uma delas,

— as concentrações no ar devem indicar-se em unidades de massa (mg/l, mg/m^3, etc.); podem igualmente indicar-se unidades de volume (ppm, ppb, etc.) entre parêntesis,

— distribuição granulométrica, diâmetro aerodinâmico mediano da massa (MMAD) e desvio-padrão geométrico (σ_g), incluindo os métodos de cálculo correspondentes; indicar também o resultado de cada análise granulométrica efetuada.

Condições de realização dos ensaios

— elementos sobre a preparação do produto químico estudado, nomeadamente sobre eventuais métodos de redução da granulometria de sólidos ou de preparação de soluções do produto químico. Se o recurso a processos mecânicos for passível de ter alterado a composição do produto químico em estudo, incluir os resultados das análises efetuadas para verificar a composição deste,

— descrição (de preferência complementada por um esquema) do equipamento utilizado para gerar a atmosfera ensaiada e para expor os animais a essa atmosfera,

— elementos sobre o método de análise química utilizado e sobre a validação desse método (incluindo o rendimento da recuperação do produto químico em estudo do meio amostrado),

— Fundamentação da escolha das concentrações utilizadas nos ensaios.

Resultados

— quadro com a temperatura, a humidade e o caudal de ar nas câmaras,

— quadro com as concentrações nominais e reais nas câmaras,

— quadro com os dados granulométricos, nomeadamente dados analíticos sobre a colheita de amostras, a distribuição granulométrica e os cálculos de MMAD e σ_g,

— quadro com os dados de resposta e as concentrações correspondentes a cada animal (animais que apresentaram sinais de toxicidade, incluindo mortalidade, e natureza, intensidade e duração dos efeitos),

— pesos corporais de cada animal registados durante os dias do estudo, bem como a data e o momento da morte, se anterior à eutanásia programada; aparecimento, evolução e eventual reversibilidade de sinais de toxicidade em cada animal,

▼M4

— resultados da autópsia e resultados histopatológicos correspondentes a cada animal, se disponíveis,

— categoria no sistema de classificação, embalagem e rotulagem e valor-limite da CL_{50}.

Discussão e interpretação dos resultados

— deve ser dada especial atenção à descrição dos métodos utilizados para satisfazer os critérios deste método de ensaio, nomeadamente no que respeita à concentração-limite e à granulometria,

— examinar em que medida, com base nos resultados globais, as partículas são respiráveis, em especial se os critérios granulométricos não forem satisfeitos,

— a apreciação global do estudo deve incidir igualmente na coerência dos métodos utilizados para determinar as concentrações nominal e real e deve dar conta da relação entre estas concentrações,

— referir a causa provável da morte e o modo de ação predominante (sistémico ou local),

— explicar por que razão terá sido necessário eutanasiar animais que apresentavam sinais de dor ou de grande sofrimento continuado, com base nos critérios do documento de orientações da OCDE relativo aos parâmetros eticamente mensuráveis (7).

REFERÊNCIAS:

1) Capítulo B.2 deste anexo, "Toxicidade aguda (inalação)".

2) Holzhütter H.-G., Genschow E., Diener W., Schlede E. (2003). Dermal and Inhalation Acute Toxicity Class Methods: Test Procedures and Biometric Evaluations for the Globally Harmonized Classification System. *Arch. Toxicol.* 77:243-254.

3) Diener W., Kayser D., Schlede E. (1997). The Inhalation Acute-Toxic-Class Method; Test Procedures and Biometric Evaluations. *Arch. Toxicol.* 71:537--549.

4) Diener W., Schlede E. (1999). Acute Toxic Class Methods: Alternatives to LD/LC_{50} Tests. *ALTEX* 1:129-134.

5) Capítulo B.1.tris deste anexo, "Toxicidade oral aguda – Método de classificação de toxicidade aguda".

6) OCDE (2009). Report on Biostatistical Performance Assessment of the Draft TG 436 Acute Toxic Class Testing Method for Acute Inhalation Toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 105. OCDE, Paris. Disponível em http://www.oecd.org/env/testguidelines.

7) OCDE (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19. Disponível em http://www.oecd.org/env/testguidelines.

8) OCDE (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39. OCDE, Paris. Disponível em http://www.oecd.org/env/testguidelines.

9) Regulamento (CE) n.º 1272/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16 de dezembro de 2008, relativo à classificação, rotulagem e embalagem de substâncias e misturas, que altera e revoga as Diretivas 67/548/CEE e 1999/45/CE, e altera o Regulamento (CE) n.º 1907/2006 (JO L 353 de 31.12.2008, p. 1).

▼**M4**

10) Capítulo B.40 deste anexo, "Corrosão da pele *in vitro*: Ensaio da resistência elétrica transcutânea (RET)".

11) Capítulo B.40.A deste anexo, "Corrosão da pele *in vitro*: Ensaio em modelos de pele humana".

12) OCDE (2005). In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion. OCDE Guideline for testing of chemicals No. 435. OCDE, Paris. Disponível em http://www.oecd.org/env/testguidelines.

13) Phalen R.F. (2009). Inhalation Studies: Foundations and Techniques (2.ª edição). Informa Healthcare, New York.

14) SOT (1992). Technical Committee of the Inhalation Specialty Section, Society of Toxicology (SOT). Recommendations for the Conduct of Acute Inhalation Limit Tests. *Fund. Appl. Toxicol.* 18:321-327.

15) Pauluhn J., Thiel A. (2007). A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. *J. Appl. Toxicol.* 27:160--167.

16) ONU (2007). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). ST/SG/AC.10/30, ONU, Nova Iorque e Genebra. Disponível em http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_welcome_e.html.

▼**M4**

Apêndice 1

DEFINIÇÃO

Produto químico em estudo: qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado este método de ensaio.

▼M4

Apêndice 2

Procedimento a seguir para gases em função da concentração (ppm) INICIAL (4 h)

Observações gerais ([1])

Esquematiza-se neste apêndice o procedimento de ensaio a seguir consoante a concentração inicial.

Apêndice 2a: concentração inicial de 100 ppm;

Apêndice 2b: concentração inicial de 500 ppm;

Apêndice 2c: concentração inicial de 2 500 ppm;

Apêndice 2d: concentração inicial de 20 000 ppm.

O procedimento de ensaio segue as setas correspondentes ao número de animais eutanasiados ou que morreram.

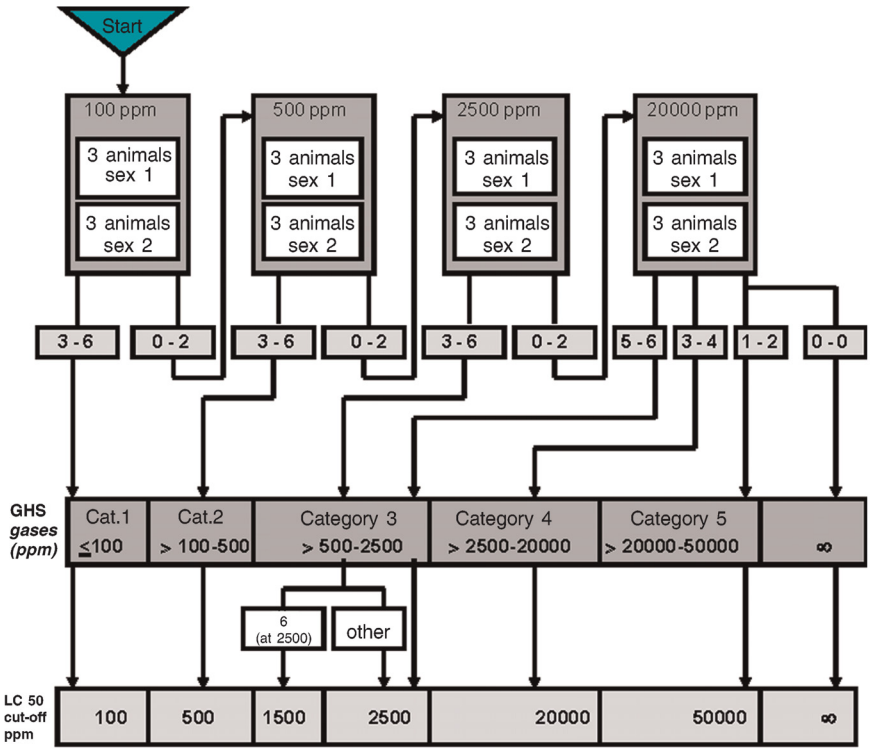
([1]) Os quadros seguintes reportam-se ao sistema GHS (Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos). O equivalente na União Europeia é o Regulamento (CE) n.º 1272/2008 (9), que não prevê a categoria 5 para a toxicidade aguda por inalação.

▼M4

Apêndice 2a

Acute Inhalation Toxicity:

Test Procedure with a starting concentration of 100 ppm/4 h for gases



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step

— 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: unclassified

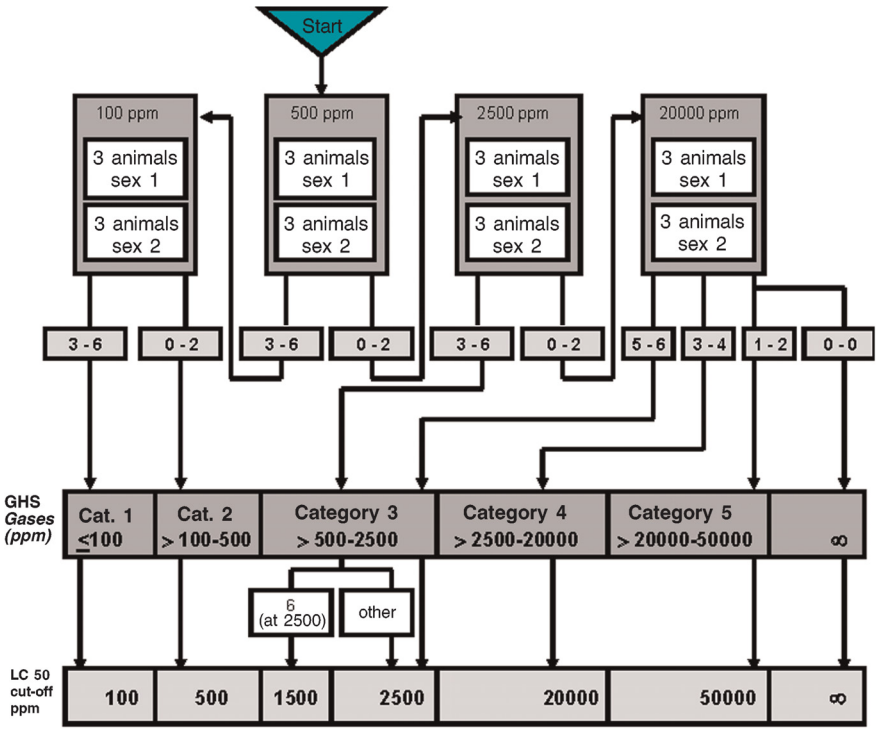
— Testing at ≥ 20000 ppm/4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

Apêndice 2b

Acute Inhalation Toxicity:

Test Procedure with a starting concentration of 500 ppm/4h for gases



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step

— 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: unclassified

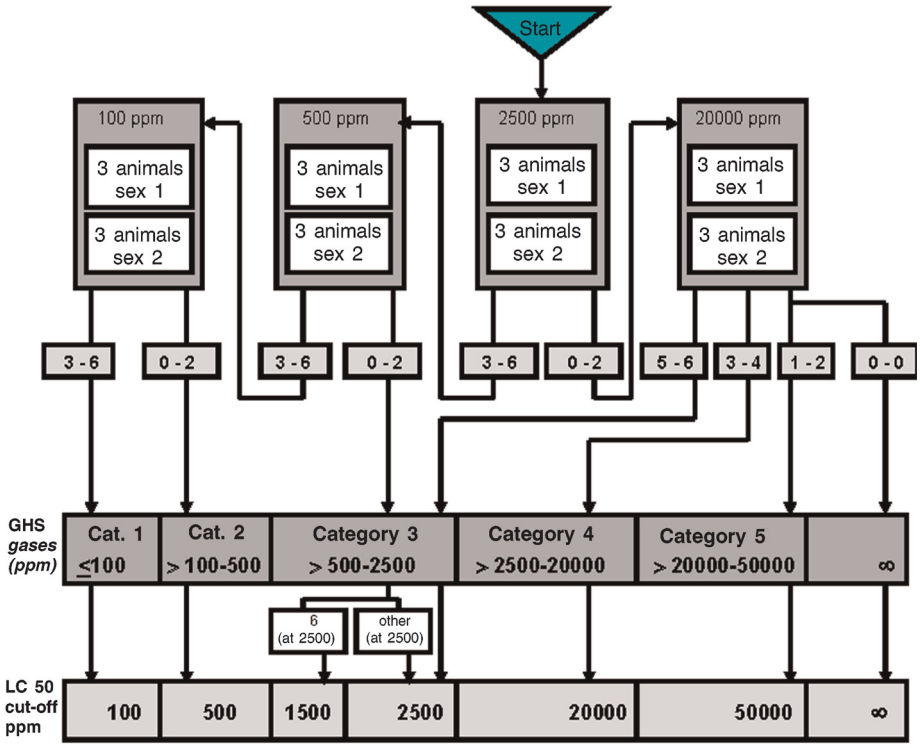
— Testing at ≥ 20000 ppm/4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

Apêndice 2c

Acute Inhalation Toxicity:

Test Procedure with a starting concentration of 2 500 ppm/4h for gases



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step

— 0–6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: unclassified

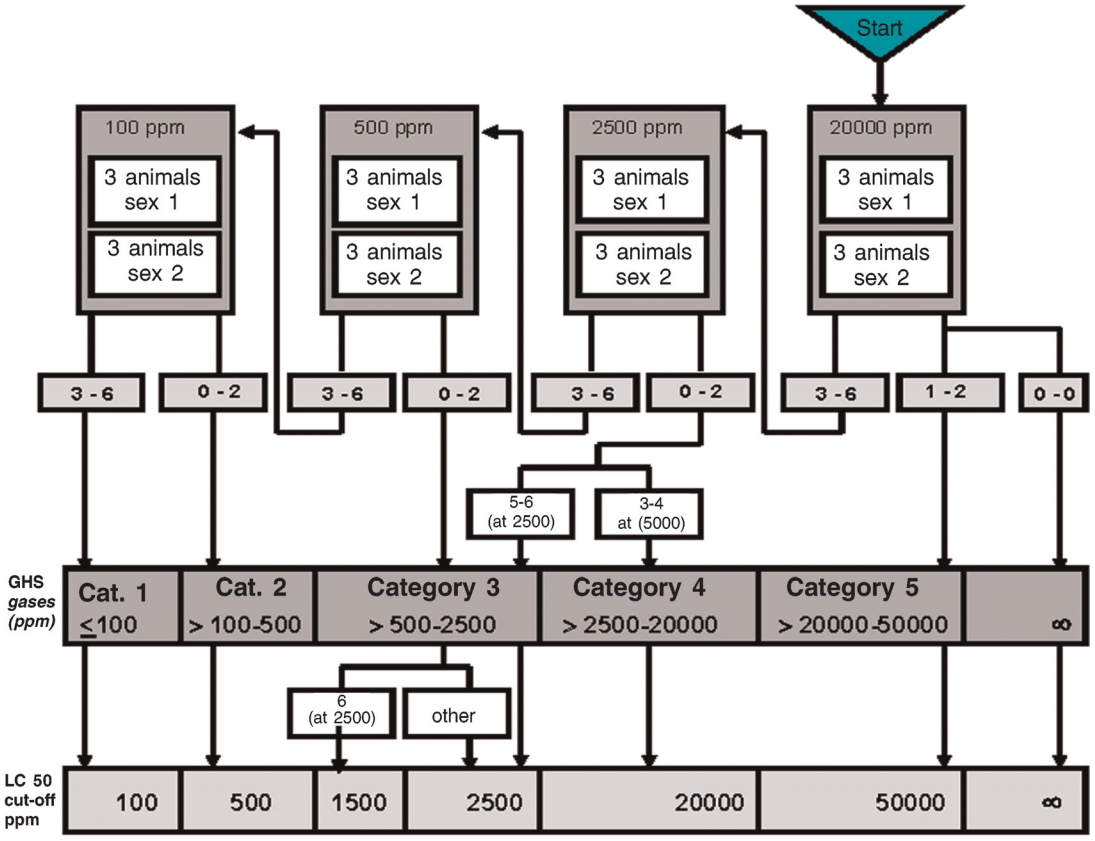
— Testing at ≥ 20000 ppm/4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

Apêndice 2d

Acute Inhalation Toxicity:

Test Procedure with a starting concentration of 20 000 ppm/4h for gases



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step

— 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: unclassified

— Testing at ≥ 20000 ppm/4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

Apêndice 3

Procedimento a seguir para vapores em função da concentração (mg/l) inicial (4 h)

Observações gerais ([1])

Esquematiza-se neste apêndice o procedimento de ensaio a seguir consoante a concentração inicial.

Apêndice 3a: concentração inicial de 0,5 mg/l;

Apêndice 3b: concentração inicial de 2,0 mg/l;

Apêndice 3c: concentração inicial de 10 mg/l;

Apêndice 3d: concentração inicial de 20 mg/l.

O procedimento de ensaio segue as setas correspondentes ao número de animais eutanasiados ou que morreram.

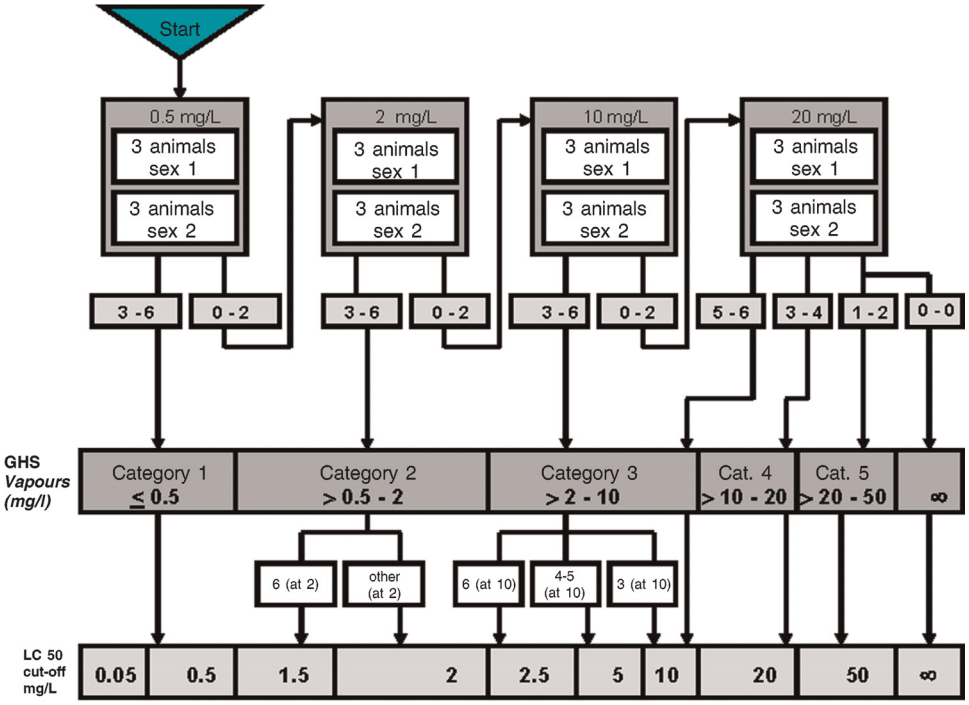
([1]) Os quadros seguintes reportam-se ao sistema GHS (Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos). O equivalente na União Europeia é o Regulamento (CE) n.º 1272/2008 (9), que não prevê a categoria 5 para a toxicidade aguda por inalação.

▼M4

Apêndice 3a

Acute Inhalation Toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 0,5 mg/L/4h for vapours



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step

— 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: unclassified

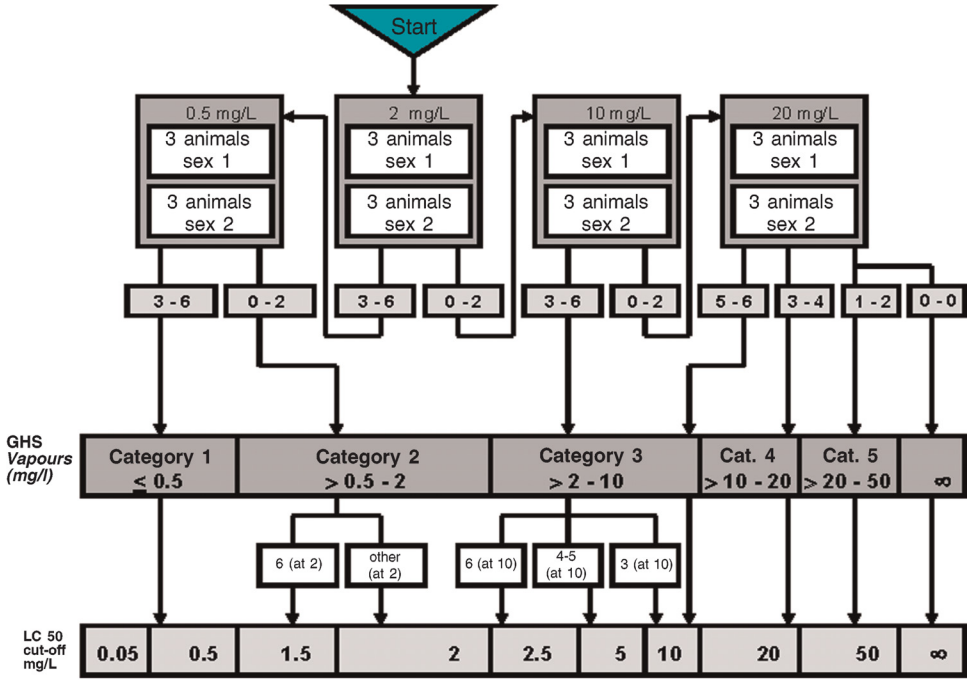
— Testing at 50 mg/L/4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

Apêndice 3b

Acute Inhalation Toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 2 mg/L/4h for vapours



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step

— 0–6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: unclassified

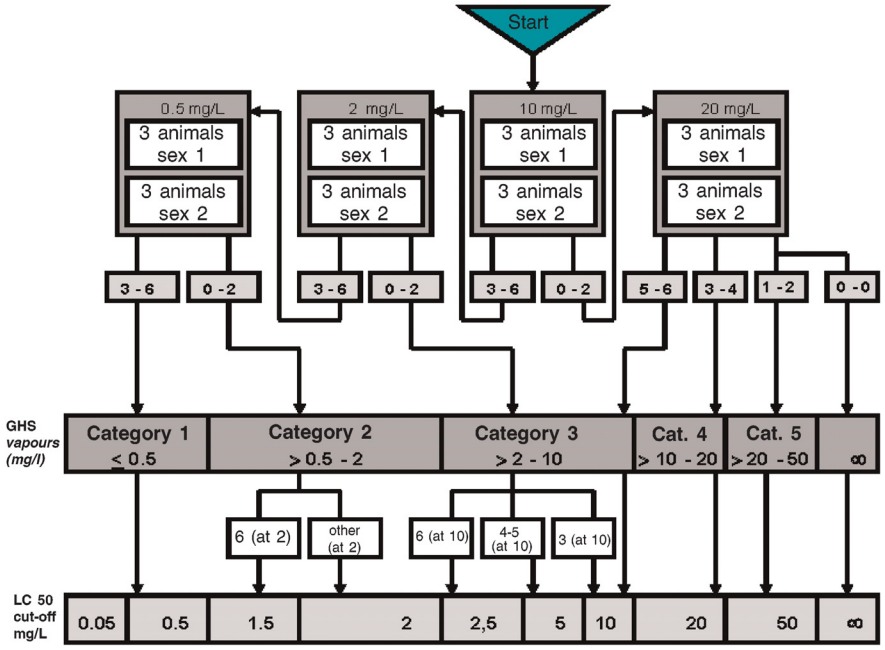
— Testing at 50 mg/L4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

Apêndice 3c

Acute Inhalation Toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 10 mg/L/4h for vapours



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used pers step

— 0–6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: unclassified

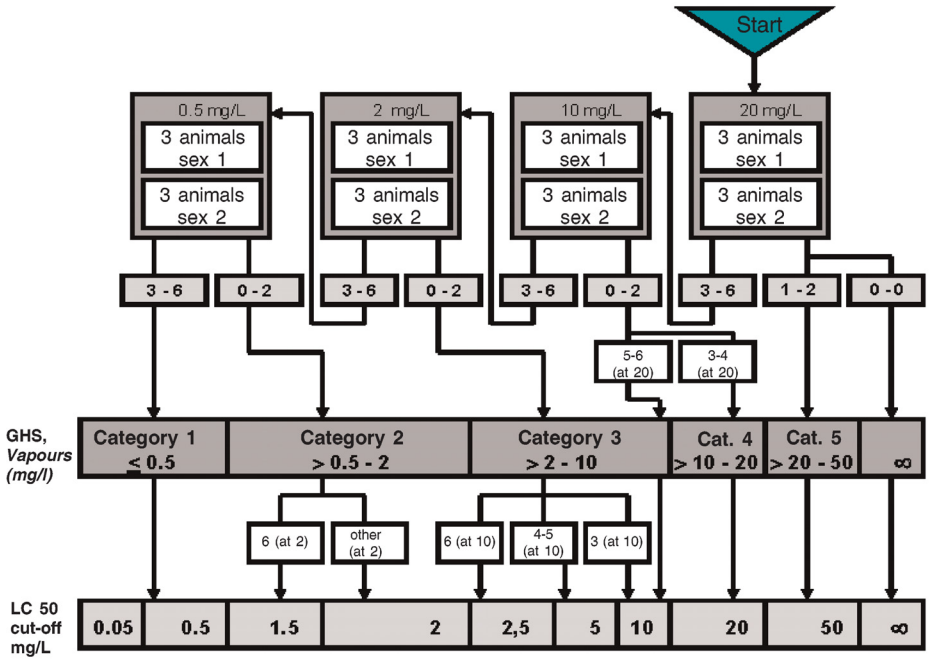
— Testing at 50 mg/L/4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

Apêndice 3d

Acute Inhalation Toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 20 mg/L/4h for vapours



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step

— 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: unclassified

— Testing at 50 mg/L/4h: see Guidance Document 39(8)

▼**M4**

Apêndice 4

procedimento a seguir para aerossóis em função da concentração (mg/l) inicial (4 h)

Observações gerais ([1])

Esquematiza-se neste apêndice o procedimento de ensaio a seguir consoante a concentração inicial.

Apêndice 4a: concentração inicial de 0,05 mg/l;

Apêndice 4b: concentração inicial de 0,5 mg/l;

Apêndice 4c: concentração inicial de 1 mg/l;

Apêndice 4d: concentração inicial de 5 mg/l.

O procedimento de ensaio segue as setas correspondentes ao número de animais eutanasiados ou que morreram.

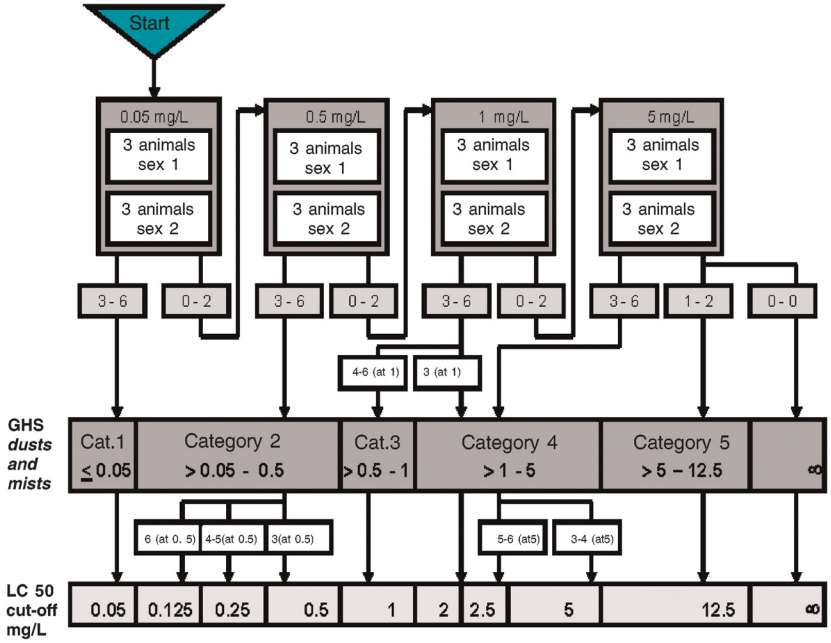
([1]) Os quadros seguintes reportam-se ao sistema GHS (Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos). O equivalente na União Europeia é o Regulamento (CE) n.º 1272/2008 (9), que não prevê a categoria 5 para a toxicidade aguda por inalação.

▼M4

Apêndice 4a

Acute Inhalation Toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 0,05 mg/L/4h for vapours



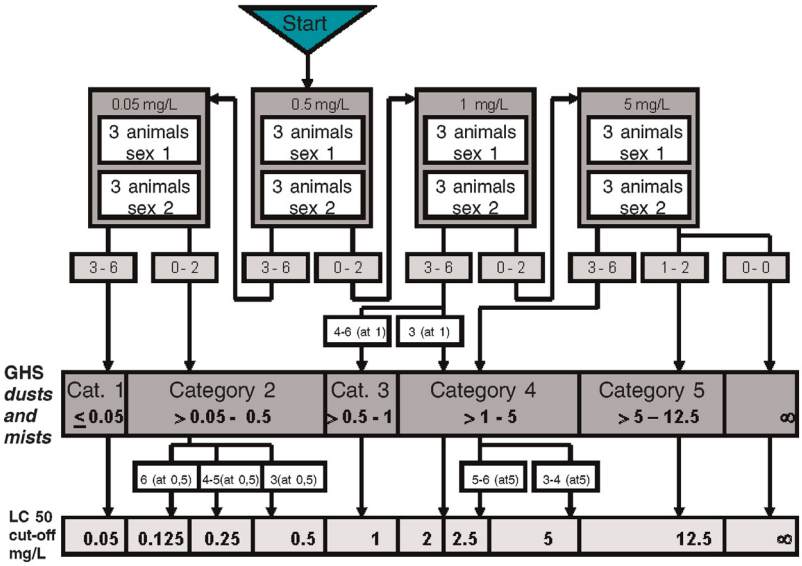
— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step
— 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion
— GHS: Globally Harmonized Classification System
— ∞: unclassified
— Testing at 12.5 mg/L4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

Apêndice 4b

Acute Inhalation Toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 0,5 mg/L/4h for aerosols



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step

— 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: unclassified

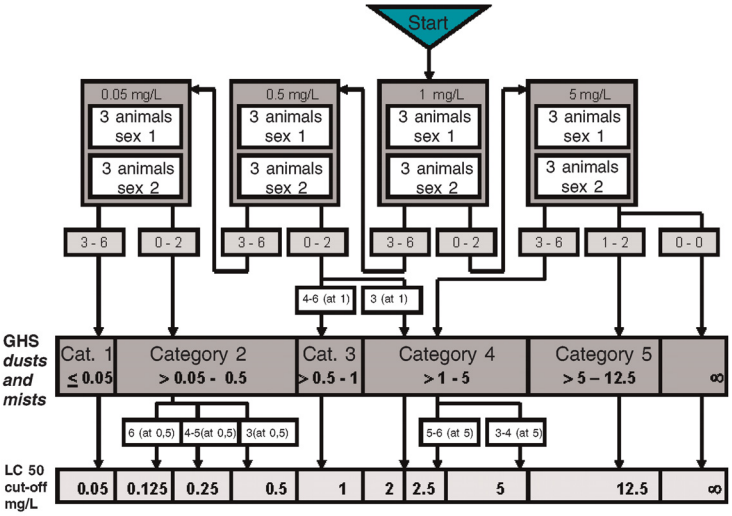
— Testing at 12.5 mg/L/4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

Apêndice 4c

Acute inhalation toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 1 mg/L/4h for aerosols



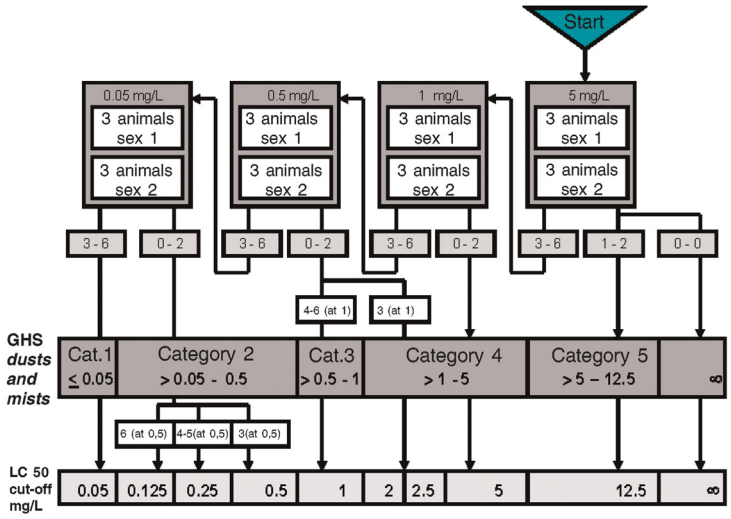
— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step
— 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion
— GHS: Globally Harmonized Classification System
— ∞: unclassified
— Testing at 12.5 mg/L/4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

Apêndice 4d

Acute Inhalation Toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 5 mg/L/4h for aerosols



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step
— 0-6 : Number of moribund or dead animals/tested concentraion
— GHS: Globally Harmonized Classification System
— ∞: unclassified
— Testing at 12.5 mg/L/4h: see Guidance Document 39 (8)»

▼M5

B.53. ESTUDO DE NEUROTOXICIDADE DURANTE O DESENVOLVIMENTO

INTRODUÇÃO

1. Este método é equivalente ao *Test Guideline* TG 426 (2007) da OCDE. Em junho de 1995, um grupo de trabalho da OCDE que se ocupa dos efeitos tóxicos durante a reprodução e o desenvolvimento debateu em Copenhaga a necessidade de atualizar os *Test Guidelines* relativos à toxicidade durante a reprodução e o desenvolvimento existentes à data, bem como de elaborar novas orientações para parâmetros ainda não abrangidos (1). Esse grupo de trabalho recomendou que se elaborasse um *Test Guideline* relativo à neurotoxicidade durante o desenvolvimento, com base nas orientações da Agência de Proteção do Ambiente (EPA) dos E.U.A., as quais foram entretanto revistas (2). Em junho de 1996, realizou-se em Copenhaga uma segunda reunião de consultas com o objetivo de fornecer ao Secretariado orientações sobre as linhas gerais de um novo *Test Guideline* relativo à neurotoxicidade durante o desenvolvimento, designadamente acerca dos principais elementos do mesmo, como a escolha da espécie animal, o período de administração, o período de ensaio, os parâmetros a avaliar e os critérios de avaliação dos resultados. Em 1998, foram publicadas orientações da referida agência para a avaliação do risco de neurotoxicidade (3). Em outubro de 2000, realizaram-se paralelamente uma reunião de consulta de peritos da OCDE e jornadas do Instituto de Ciências do Risco do *International Life Sciences Institute* (ILSI). Em 2005, realizou-se em Tóquio uma reunião de consulta de peritos. Estas reuniões visaram debater as questões científicas e técnicas relativas ao *Test Guideline* em causa, tendo as recomendações delas emanadas (4)(5)(6)(7) sido tidas em conta na elaboração do presente método. Os documentos de orientações da OCDE n.º 43 (ensaio e avaliação de efeitos tóxicos na reprodução) (8) e n.º 20 (ensaios de neurotoxicidade) (9) contêm informações adicionais sobre a execução do presente método, a interpretação dos resultados do mesmo e a terminologia nele utilizada.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

2. É sabido que diversos produtos químicos têm efeitos neurotóxicos durante o desenvolvimento, na espécie humana e noutras espécies (10)(11)(12)(13). A fim de se determinarem e avaliarem as características tóxicas de um produto químico, pode ser necessário determinar a neurotoxicidade potencial do mesmo durante o desenvolvimento. Os estudos de neurotoxicidade durante o desenvolvimento visam gerar dados, nomeadamente de caracterização da resposta à dosagem, relativos aos efeitos funcionais e morfológicos potenciais no sistema nervoso em desenvolvimento da progenitura, após exposição intrauterina ou nos primeiros estádios de vida após o nascimento.

3. Os estudos de neurotoxicidade durante o desenvolvimento podem realizar-se separadamente, ser integrados em estudos de toxicidade durante a reprodução e/ou de neurotoxicidade em indivíduos adultos — por exemplo, os métodos B.34 (14), B.35 (15), B.43 (16) — ou ser complementares de estudos de toxicidade durante o desenvolvimento pré-natal (por exemplo, o método B.31 — (17). Se o estudo de neurotoxicidade durante o desenvolvimento for incorporado noutro estudo ou o complementar. é imperativo manter a integridade de ambos os tipos de estudos. Os ensaios devem respeitar a legislação ou as orientações estatais ou institucionais aplicáveis no que respeita à utilização de animais de laboratório em investigação — por exemplo (18).

4. Antes de efetuarem o estudo, os laboratórios devem ponderar todas as informações disponíveis sobre o produto químico em causa, nomeadamente a identidade e a estrutura do mesmo, as propriedades físico-químicas do produto químico, os resultados de outros ensaios de toxicidade *in vitro* ou *in vivo* deste, dados toxicológicos disponíveis sobre produtos químicos estruturalmente afins e ainda a utilização ou utilizações previstas do produto químico em questão. Estas informações ajudarão a escolher uma dose inicial adequada e são necessárias para comprovar a pertinência do ensaio para a proteção da saúde humana.

▼M5

PRINCÍPIO DO MÉTODO

5. Administra-se o produto químico em estudo a animais durante os períodos de gestação e de lactação. Efetuam-se ensaios nas progenitoras para avaliar os efeitos nas fêmeas grávidas e em lactação, podendo igualmente obter-se informações comparativas entre aquelas e a sua progenitura. Procede-se à avaliação de neurotoxicidade em progenitura selecionada aleatoriamente das ninhadas. A avaliação consiste em exames destinados a detetar anomalias neurológicas macroscópicas e comportamentais, nomeadamente ao nível do desenvolvimento físico, da ontogenia comportamental, da atividade motora, das funções motoras e sensoriais, da aprendizagem e da memória, bem como na determinação da evolução ponderal do cérebro e na avaliação de neuropatologias durante o desenvolvimento pós-natal e na idade adulta.

6. Se a aplicação deste método constituir um estudo separado, podem submeter-se animais disponíveis em cada grupo a protocolos neurocomportamentais, neuropatológicos, neuroquímicos ou eletrofisiológicos específicos suscetíveis de complementar os dados fornecidos pelos exames recomendados no presente método (16)(19)(20)(21). Esses protocolos podem revelar-se particularmente úteis se observações empíricas, efeitos previstos ou o mecanismo ou modo de ação apontarem para um determinado tipo de neurotoxicidade. Os protocolos em questão podem ser aplicados às progenitoras ou à progenitura. Podem igualmente executar-se protocolos *ex vivo* ou *in vitro* complementares, desde que estes não alterem a integridade dos protocolos *in vivo*.

PREPARATIVOS PARA O ENSAIO

Escolha da espécie animal

7. A espécie preferida é o rato, mas podem utilizar-se outras espécies adequadas. Importa, porém, salientar que os dias de gestação e de desenvolvimento pós-natal especificados neste método correspondem às estirpes de ratos mais utilizadas, devendo escolher-se durações comparáveis se forem utilizadas estirpes inabituais de ratos ou espécies diferentes. Se forem utilizadas outras espécies, será necessário justificá-lo com base em dados toxicológicos, farmacocinéticos e/ou outros. A justificação da opção tomada deve apoiar-se em avaliações neurocomportamentais e neuropatológicas pós-natais já disponíveis, específicas da espécie em causa. Se um ensaio anterior tiver gerado resultados preocupantes, deve ser ponderada a utilização da espécie ou estirpe que os gerou. Dado que as diversas estirpes de ratos têm desempenhos diferentes, importa comprovar a adequação da fecundidade e da reatividade da estirpe selecionada. Se forem utilizadas outras espécies, é necessário documentar a fiabilidade e sensibilidade da deteção da neurotoxicidade durante o desenvolvimento das espécies em causa.

Condições de alojamento e de alimentação

8. A temperatura do biotério deve ser de 22 °C ± 3 °C. A humidade relativa deve estar compreendida entre 50 % e 60 %, embora sejam aceitáveis valores compreendidos entre 30 %, no mínimo, e um valor máximo que, preferencialmente, não deve exceder 70 %, salvo durante os períodos de limpeza do biotério. A iluminação deve ser artificial, com uma sequência de 12 horas de luz seguidas de 12 horas de escuridão. Também se pode inverter o ciclo de iluminação antes do acasalamento e durante todo o estudo, a fim de se proceder à avaliação dos parâmetros funcionais e comportamentais durante o período de obscuridade (sob luz vermelha), isto é, durante o período de atividade normal dos animais (22). As alterações do ciclo iluminação-obscuridade devem ter um período de aclimatação adequado, que permita aos animais adaptarem-se ao novo ciclo. Na alimentação, podem utilizar-se dietas convencionais de laboratório e deve ser fornecida água de beber sem restrições. Deve indicar-se no relatório o tipo de alimentação e de água e analisar-se a presença de contaminantes em ambos.

▼M5

9. Os animais podem ser alojados individualmente ou em pequenos grupos do mesmo sexo. O acasalamento deve ocorrer em gaiolas adequadas para o efeito. Uma vez comprovado o acasalamento ou, o mais tardar, no 15.º dia de gestação, as fêmeas cobertas devem ser alojadas separadamente em gaiolas de maternidade. As gaiolas devem ser dispostas de forma a minimizar possíveis efeitos derivados do seu posicionamento. As fêmeas cobertas que se aproximem do termo da gestação devem dispor de materiais de nidificação definidos apropriados. É sabido que manipulações inadequadas ou agitação durante a gravidez podem ter efeitos indesejados, nomeadamente abortos espontâneos ou alterações do desenvolvimento fetal ou pós-natal. A fim de evitar mortalidade fetal devida a fatores não relacionados com a exposição, os animais devem ser cuidadosamente manipulados durante a gestação e deve evitar-se qualquer agitação provocada por fatores exteriores, como ruído excessivo

Preparação dos animais

10. Os animais utilizados devem ser saudáveis, ter sido aclimatados às condições laboratoriais e não devem ter participado em experiências anteriores, salvo se o estudo estiver integrado noutro (ver o ponto 3). É necessário caracterizar a espécie, a estirpe, a proveniência, o sexo, o peso e a idade dos animais utilizados no estudo. Deve atribuir-se a cada animal um número de identificação único, com o qual o animal seja marcado. Os animais de todos os grupos estudados devem, tanto quanto possível, ter peso e idade uniformes e pertencer à gama normal da espécie e estirpe em estudo. As fêmeas utilizadas para todos os níveis de dosagem devem ser jovens adultas nulíparas. Não devem acasalar-se entre si animais da mesma ninhada, sendo necessário tomar precauções para o evitar. Considera-se dia 0 de gravidez aquele em que se observa um rolhão vaginal e/ou esperma. No caso de se comprarem fêmeas grávidas a um fornecedor, deve proporcionar-se-lhes um período de aclimatação adequado (2 a 3 dias, por exemplo). As fêmeas cobertas devem ser distribuídas aleatória e, o mais possível, uniformemente pelos grupos de controlo e pelos grupos expostos (recomenda-se, por exemplo, a aplicação de um protocolo de distribuição aleatória estratificada, nomeadamente baseado no peso corporal, para uniformizar a distribuição por todos os grupos). Devem repartir-se as fêmeas cobertas pelo mesmo macho uniformemente por todos os grupos.

PROCEDIMENTO DE ENSAIO

Número e sexo dos animais

11. Cada grupo exposto e cada grupo de controlo deve compreender um número de fêmeas grávidas a expor ao produto químico em estudo suficiente para que a progenitura por elas gerada seja em número adequado para a avaliação de toxicidade. Para cada nível de dosagem recomendam-se 20 ninhadas. Admite-se o recurso a modelos de grupos escalonados ou de administração em replicado, desde que se atinja o número total previsto de ninhadas por grupo e se utilizem modelos estatísticos adequados para tratar os replicados.

12. O mais tardar ao quarto dia após o nascimento, deve ajustar-se o tamanho de cada ninhada eliminando aleatoriamente as crias em excesso, de modo que todas as ninhadas tenham o mesmo número de animais (23). As ninhadas não devem ter mais crias do que a média da estirpe de roedor utilizada (8-12). Tanto quanto possível, as ninhadas devem ter o mesmo número de machos e de fêmeas. Não é admissível uma eliminação seletiva de crias, por exemplo, baseada no peso corporal. Após a normalização das ninhadas por eliminação de crias e antes de passar ao ensaio dos parâmetros funcionais, é necessário identificar individualmente as crias destinadas aos ensaios a decorrer antes ou depois do desmame, recorrendo a um método não-agressivo de identificação que lhes seja aplicável (ver, por exemplo, a referência 24).

▼M5

Afetação dos animais aos ensaios funcionais e comportamentais, às determinações do peso cerebral e às avaliações neuropatológicas

13. O presente método admite várias abordagens no que respeita à afetação dos animais expostos *in utero* e por via do aleitamento aos ensaios funcionais e comportamentais, à determinação da maturidade sexual, à pesagem do cérebro e às avaliações neuropatológicas (25). Desde que a integridade dos ensaios iniciais exigidos não fique comprometida, é possível acrescentar os outros ensaios — da função neurocomportamental (por exemplo, do comportamento social), neuroquímicos ou neuropatológicos — que em cada caso se justifiquem.

14. Selecionam-se em cada grupo de dosagem as crias a destinar às avaliações de parâmetros ao quarto dia após o nascimento ou posteriormente. Tanto quanto possível, a seleção das crias deve ser de molde a que participe em cada ensaio o mesmo número de machos e de fêmeas de cada ninhada integrada em cada grupo de dosagem. No caso dos ensaios da atividade motora, deve utilizar-se o mesmo par macho e fêmea em todas as idades anteriores ao desmame (ver o ponto 35). Em todos os outros ensaios, podem afetar-se a cada ensaio comportamental o mesmo par de animais ou pares diferentes. Para evitar a confusão dos efeitos da idade com treino adquirido nas medições já efetuadas, pode ser necessário utilizar crias diferentes nos ensaios de comparação da função cognitiva entre animais recentemente desmamados e animais adultos (26)(27). Na ocasião do desmame (ao 21.º dia após o nascimento), as crias não selecionadas para os ensaios podem ser eutanasiadas. As alterações de afetações de crias devem ser mencionadas no relatório. A unidade de medida estatística deve ser a ninhada (ou a progenitora) e não a cria.

15. Há diferentes maneiras de afetar crias aos exames anteriores ou posteriores ao desmame, aos testes cognitivos, aos exames patológicos, etc. (ver um modelo geral na figura 1 e exemplos no apêndice 1). É o seguinte o número mínimo de animais recomendado em cada grupo de dosagem para os exames anteriores ou posteriores ao desmame:

Exames clínicos e peso corporal	Todos os animais
Exames clínicos aprofundados	20 de cada sexo (1 de cada sexo por ninhada)
Pesagem cerebral (após fixação) 11 a 22 dias após o nascimento	10 de cada sexo (1 de cada ninhada)
Pesagem cerebral (sem fixação) aproximadamente 70 dias após o nascimento	10 de cada sexo (1 de cada ninhada)
Neuropatologia (fixação por perfusão ou imersão) 11 a 22 dias após o nascimento	10 de cada sexo (1 de cada ninhada)
Neuropatologia (fixação por perfusão) aproximadamente 70 dias após o nascimento	10 de cada sexo (1 de cada ninhada)
Maturidade sexual	20 de cada sexo (1 de cada sexo por ninhada)
Outros indicadores do desenvolvimento (facultativo)	Todos os animais
Ontogenia comportamental	20 de cada sexo (1 de cada sexo por ninhada)
Atividade motora	20 de cada sexo (1 de cada sexo por ninhada)
Funções motoras e sensoriais	20 de cada sexo (1 de cada sexo por ninhada)
Aprendizagem e memória	10 de cada sexo (a) (1 de cada ninhada)

(a) Consoante a sensibilidade dos testes da função cognitiva, pode ponderar-se utilizar no estudo um número maior de animais, por exemplo, um macho e uma fêmea de cada ninhada (ver a afetação dos animais no apêndice 1). O documento de orientações n.º 43 da OCDE (8) fornece mais indicações sobre a dimensão das amostras.

▼M5

Dosagem

16. Devem utilizar-se pelo menos três níveis de dosagem e um grupo de controlo em paralelo. Os níveis de dosagem devem ser espaçados de forma a produzir uma gradação de efeitos tóxicos. Salvo se as doses estiverem limitadas pela natureza físico-química ou pelas propriedades biológicas do produto químico, deve selecionar-se para dose mais elevada um nível que induza alguma toxicidade nas progenitoras (por exemplo, sinais clínicos, diminuição do ganho de peso corporal — mas não mais de 10 % — e/ou indícios de toxicidade limitada pela dose num órgão-alvo). Com algumas exceções, a dose mais elevada não deve exceder 1 000 mg/kg de peso corporal/dia. Por exemplo, a exposição humana previsível pode aconselhar uma dose mais elevada. Em alternativa, podem efetuar-se estudos-piloto ou estudos exploratórios preliminares para determinar a dosagem mais elevada que deve ser utilizada para produzir um determinado nível mínimo de toxicidade nas progenitoras. Se tiver sido demonstrado, num estudo normal de toxicidade durante o desenvolvimento ou num estudo-piloto, que o produto químico em estudo tem efeitos tóxicos durante o desenvolvimento, a dose mais elevada deve ser a dose máxima que não induz na progenitura níveis excessivos de toxicidade, nem malformações ou mortalidade intrauterina ou neonatal, passíveis de impedir uma avaliação significativa da neurotoxicidade. A dose mais baixa não deve gerar nenhum indício de toxicidade, incluindo neurotoxicidade, nas progenitoras nem durante o desenvolvimento. Devem selecionar-se uma sequência decrescente de doses, que permita correlacionar as respostas observadas com as doses administradas e evidenciar um nível sem observação de efeitos adversos (NOAEL), ou doses próximas do limite de deteção, que permitam determinar uma dose de referência. O intervalo ótimo entre doses consecutivas é frequentemente definido por um fator de 2 a 4. A inclusão de um quarto grupo de dosagem é muitas vezes preferível ao uso de intervalos muito grandes (por exemplo, fatores superiores a 10) entre as dosagens.

17. Na escolha das doses devem ter-se em conta os dados disponíveis sobre a toxicidade do produto químico em estudo ou de matérias afins, bem como informações adicionais sobre o metabolismo e a toxicocinética dos mesmos. Estas informações também poderão servir para demonstrar a adequação do programa de dosagem. Deve ponderar-se a possibilidade de administração direta às crias, com base nas informações relativas à exposição e nos dados farmacocinéticos disponíveis (28)(29). Antes de efetuar estudos por administração direta das doses, é necessário pesar cuidadosamente os prós e os contras (30).

18. O grupo de controlo em paralelo deve ser um grupo ficticiamente exposto ao produto químico em estudo ou, se for usado um veículo para administrar o produto químico, um grupo de controlo do veículo. Normalmente, deve administrar-se a todos os animais o mesmo volume do produto químico em estudo ou do veículo, proporcionalmente ao peso corporal. Se for usado um veículo ou outro aditivo para facilitar a administração das doses, devem ter-se em conta as seguintes características do veículo ou aditivo: efeitos na absorção, na distribuição, no metabolismo ou na retenção do produto químico em estudo, efeitos nas propriedades químicas do produto químico em estudo suscetíveis de alterarem as características tóxicas do mesmo e efeitos no consumo de alimentos, na ingestão de água ou no estado nutricional dos animais. O veículo não deve ter efeitos que possam interferir na interpretação do estudo, ter toxicidade neurocomportamental ou ter efeitos na reprodução ou no desenvolvimento. Ao utilizarem-se veículos novos, o grupo de controlo do veículo deve ser complementado por um grupo ficticiamente exposto ao produto químico em estudo. Os animais do(s) grupo(s) de controlo devem ser tratados de forma idêntica aos animais dos grupos expostos.

▼M5

Administração das doses

19. O produto químico em estudo e o veículo devem ser administrados pela via mais representativa da exposição humana potencial e com base nos dados metabólicos e de distribuição relativos aos animais utilizados no estudo. Prefere-se, em geral, a via oral (por exemplo sonda esofágica, incorporação na dieta ou incorporação na água de beber), mas podem utilizar-se outras vias (por exemplo via dérmica ou inalação), justificáveis por determinadas características ou pelas vias conhecidas ou previsíveis de exposição humana — para mais orientações, ver o documento de orientações n.º 43 (8). É necessário justificar a via de administração escolhida. O produto químico em estudo deve ser administrado todos os dias aproximadamente à mesma hora.

20. Normalmente, a dose administrada a cada animal é calculada com base na determinação mais recente do peso corporal do animal. O ajustamento das doses durante o último terço da gravidez deve, porém, ser feito com precaução. Se for observada toxicidade excessiva em progenitoras expostas, os animais em questão devem ser eutanasiados.

21. No mínimo, o produto químico em estudo e o veículo devem ser administrados diariamente às fêmeas cobertas, desde a implantação (sexto dia de gravidez) até ao final da lactação (21 dias após o nascimento), a fim de expor as crias ao mesmo durante o desenvolvimento neurológico pré-natal e pós-natal. A idade à qual se inicia a administração das doses e a duração e a frequência desta podem ser ajustadas se os dados disponíveis evidenciarem que outro modelo experimental corresponde melhor à exposição humana. No caso de outras espécies, as durações da administração das doses devem ser ajustadas de modo a garantir a exposição ao produto químico em todos os períodos precoces do desenvolvimento do cérebro (nos períodos equivalentes ao crescimento pré-natal e pós-natal precoce do cérebro humano). A administração das doses pode começar no início da gravidez (dia zero de gravidez), embora deva ponderar-se a possibilidade de o produto químico em estudo provocar mortalidade antes mesmo da implantação. O início da administração das doses ao sexto dia de gravidez evitará esse risco, mas não haverá então exposição ao produto químico em estudo nos estádios de desenvolvimento compreendidos entre o dia zero e o sexto dia de gravidez. Se o laboratório comprar fêmeas cobertas em data determinada, não será possível iniciar a administração do produto químico no dia zero de gravidez, pelo que o sexto dia de gravidez se afigura uma boa opção. O laboratório que efetua os ensaios deve estabelecer o programa de administração das doses em função das informações pertinentes de que disponha sobre os efeitos do produto químico em estudo, da experiência adquirida e de considerações logísticas. Nessa ótica, o programa definido pode prever que a administração das doses se prolongue para além do desmame. O produto químico em estudo não deve ser administrado no dia do parto aos animais que ainda não tenham parido toda a progenitura. Em geral, presume-se que as crias são expostas através do leite materno. Todavia, deve ponderar-se a administração direta de doses às crias, se faltarem indícios de que a progenitura está continuamente exposta. Esses indícios podem provir, por exemplo, de dados farmacocinéticos, da toxicidade eventualmente detetada na progenitura ou de alterações de biomarcadores (28).

EXAMES

Exame das progenitoras

22. Pelo menos uma vez por dia, deve verificar-se cuidadosamente o estado de saúde de todas as progenitoras, incluindo os casos de morbidez ou de mortalidade.

23. Durante os períodos de exposição e de observação, devem efetuar-se com regularidade exames clínicos mais aprofundados (pelo menos duas vezes durante o período de administração durante a gestação e duas vezes durante o período de administração durante a lactação) a, pelo menos, dez progenitoras por nível de dose. Os animais devem ser examinados fora da gaiola onde se encontram alojados, por pessoal formado que não esteja a par da exposição a que os animais foram sujeitos. Os técnicos em causa devem aplicar protocolos normalizados de minimização dos erros de apreciação induzidos pela agitação dos animais e de maximização da reprodutibilidade de técnico para técnico. Tanto quanto possível, é recomendável que os exames realizados num determinado estudo o sejam pelo mesmo técnico.

▼M5

24. Os sinais observados devem ser mencionados no relatório. Sempre que possível, também deve ser mencionada no relatório a intensidade desses sinais. Entre os exames a realizar, contam-se a observação de alterações da pele, da pelagem, dos olhos e das mucosas, bem como da ocorrência de secreções ou de reações neurovegetativas (por exemplo, lacrimação, horripilação, alterações da dimensão pupilar, respiração anormal e/ou respiração pela boca e sinais inabituais ao nível da micção ou da defecação).

25. Devem igualmente ser indicadas no relatório quaisquer respostas inabituais relativas à posição corporal, ao nível de atividade (por exemplo maior ou menor exploração da zona-padrão) e à coordenação dos movimentos. Também devem ser mencionadas no relatório as alterações na marcha (por exemplo, marcha bamboleante ou ataxia), na postura (por exemplo, dorso arqueado) e na reatividade à manipulação, à colocação ou a outros estímulos ambientais, bem como a ocorrência de movimentos clónicos ou tónicos, de convulsões ou tremores, de comportamentos estereotipados (por exemplo, atos de higiene demasiado repetitivos, movimentos de cabeça pouco usuais ou movimentação repetitiva em círculo) ou estranhos (por exemplo, lamber excessivamente ou morder, automutilação, movimentação para trás, vocalização) ou de atos de agressão.

26. Devem indicar-se no relatório os sinais de toxicidade observados, o grau e a duração destes e o dia e a hora em que apareceram.

27. Os animais devem ser pesados, quando da administração da dose, pelo menos semanalmente durante o estudo, no dia do parto ou próximo deste e 21 dias após o nascimento (dia do desmame). Nos estudos que recorram a sonda gástrica, as progenitoras devem ser pesadas, pelo menos, duas vezes por semana. As doses devem ser ajustadas quanto seja necessário quando de cada pesagem. O consumo de alimentos durante a gestação e a lactação deve determinar-se pelo menos semanalmente. Se a exposição se fizer através da água de beber, o consumo de água deve ser determinado pelo menos semanalmente.

Exame da progenitura

28. Deve examinar-se cuidadosamente toda a progenitura pelo menos uma vez por dia para detetar eventuais sinais de toxicidade, incluindo casos de morbidez ou de mortalidade.

29. Durante os períodos de exposição e de observação, devem efetuar-se exames clínicos mais aprofundados da progenitura. A progenitura (pelo menos uma cria de cada sexo por ninhada) deve ser examinada por pessoal formado que não esteja a par da exposição a que os animais foram sujeitos. Os técnicos em causa devem aplicar protocolos normalizados de minimização dos erros de apreciação e de maximização da reprodutibilidade de técnico para técnico. Tanto quanto possível, é recomendável que os exames sejam realizados pelo mesmo técnico. No mínimo, devem examinar-se os parâmetros referidos nos pontos 24 e 25 adequados ao estádio de desenvolvimento em observação.

30. Devem indicar-se no relatório os sinais de toxicidade observados na progenitura, o grau e a duração destes e o dia e a hora em que apareceram.

Indicadores físicos e de desenvolvimento

31. As alterações dos indicadores de desenvolvimento anteriores ao desmame (abertura do pavilhão auditivo, abertura dos olhos, nascimento dos incisivos) estão estreitamente correlacionadas com o peso corporal (30)(31). Muitas vezes, o peso corporal é, portanto, o melhor indicador do desenvolvimento físico. Só se recomenda a medição de outros indicadores do desenvolvimento quando haja indícios anteriores de que os parâmetros em causa proporcionarão informações adicionais. Indica-se no quadro 1 quando esses parâmetros devem ser avaliados. Consoante os efeitos previstos e os resultados das primeiras medições, pode ser aconselhável aumentar o número de ocasiões de avaliação ou efetuar as medições noutros estádios do desenvolvimento.

▼M5

32. Ao avaliar o desenvolvimento físico, é preferível utilizar a idade pós-coital em vez da idade pós-natal (33). Se as crias forem examinadas no dia do desmame, recomenda-se que o exame seja efetuado antes daquele, para evitar confusões com o efeito de agitação associado ao desmame. Além disso, os exames a realizar após o desmame não devem ser realizados nos dois dias imediatos.

Quadro 1

Ocasiões da avaliação dos indicadores físicos e de desenvolvimento e parâmetros funcionais e comportamentais ([a])

Faixas etárias / Parâmetros	Pré-desmame ([b])	Adolescência ([b])	Adultos jovens ([b])
Indicadores físicos e de desenvolvimento			
Peso corporal e exames clínicos	Semanalmente ([c])	pelo menos de duas em duas semanas	pelo menos de duas em duas semanas
Peso cerebral	22 dias após o nascimento ([d])		no termo
Neuropatologia	22 dias após o nascimento ([d])		no termo
Maturidade sexual	—	oportunamente	—
Outros indicadores de desenvolvimento ([e])	oportunamente	—	—
Parâmetros funcionais e comportamentais			
Ontogenia comportamental	pelo menos duas medições		
Atividade motora (incluindo a habituação)	1-3 vezes ([f])	—	uma vez
Funções motoras e sensoriais	—	uma vez	uma vez
Aprendizagem e memória	—	uma vez	uma vez

([a]) Este quadro apresenta o número mínimo de vezes que as medições devem ser realizadas. Consoante os efeitos previstos e os resultados das primeiras medições, pode ser aconselhável aumentar o número de ocasiões de avaliação (por exemplo de animais mais velhos) ou efetuar as medições noutros estádios de desenvolvimento.

([b]) Recomenda-se que as crias não sejam examinadas nos dois dias após o desmame (ver o ponto 32). As idades de avaliação do estádio da adolescência são as seguintes: aprendizagem e memória = 25 ± 2 dias após o nascimento; funções motoras e sensoriais = 25 ± 2 dias após o nascimento. A idade recomendada para avaliar adultos jovens é de 60 a 70 dias após o nascimento.

([c]) Nos períodos de aumento rápido do peso corporal, este deve ser determinado, pelo menos, duas vezes por semana nos casos em que as doses sejam administradas diretamente às crias, para que possam ajustar-se as doses.

([d]) Se necessário, o peso cerebral pode ser determinado e as manifestações neuropatológicas podem ser avaliadas mais cedo (por exemplo 11 dias após o nascimento — ver o ponto 39).

([e]) Se for caso disso, indicar-se-ão os outros indicadores de desenvolvimento utilizados, além do peso corporal (por exemplo, a abertura dos olhos — ver o ponto 31).

([f]) Ver o ponto 35.

33. Depois de contadas as crias vivas, determina-se o sexo das mesmas, por exemplo por exame visual ou medição da distância anogenital (34)(35), e pesa-se cada cria de cada ninhada à nascença ou pouco depois, pelo menos uma vez por semana durante a lactação e, em seguida, pelo menos de duas em duas semanas. Quando da avaliação da maturidade sexual, deve determinar-se a idade e o peso corporal de, pelo menos, uma fêmea com permeabilidade vaginal (36) e um macho com descolamento do prepúcio (37) de cada ninhada.

▼M5

Ontogenia comportamental

34. Deve medir-se a ontogenia dos comportamentos escolhidos em, pelo menos, uma cria de cada sexo por ninhada durante o período etário adequado. As crias utilizadas para avaliar os comportamentos em causa devem ser sempre as mesmas em todos os dias de avaliação. Os dias em que se procede a medições devem ser distribuídos uniformemente ao longo do período de avaliação, a fim de determinar se a ontogenia de cada comportamento avaliado é normal ou se há nela alterações decorrentes da exposição (38). Seguem-se alguns exemplos de comportamentos cuja ontogenia pode ser avaliada: reflexo postural labiríntico, geotaxia negativa e atividade motora (38)(39)(40).

Atividade motora

35. Deve monitorizar-se a atividade motora (41)(42)(43)(44)(45) antes do desmame e na idade adulta. No tocante ao dia do desmame, ver o ponto 32. A duração de cada sessão de avaliação deve ser suficiente para revelar a habituação dos animais não-expostos, de controlo, durante a sessão. Recomenda-se vivamente o recurso à atividade motora para avaliar a ontogenia comportamental. No caso de as observações terem essa finalidade, os animais utilizados nas sessões anteriores ao desmame devem ser sempre os mesmos. A frequência das sessões deve ser suficiente para avaliar a ontogenia da habituação em cada sessão (44). Para isso, até ao desmame, inclusive, podem ser necessárias três ou mais sessões de avaliação (por exemplo, 13, 17 e 21 dias após o nascimento). Devem examinar-se os mesmos animais, ou animais da mesma ninhada, também na idade adulta, perto do termo do estudo (por exemplo, 60 a 70 dias após o nascimento). Se necessário, podem efetuar-se sessões de avaliação noutros dias. Deve monitorizar-se a atividade motora recorrendo a um aparelho de registo automático com capacidade para detetar aumentos e decréscimos de atividade (a atividade de base mensurável com o dispositivo não deve ser demasiado reduzida — ao ponto de inviabilizar a deteção de decréscimos de atividade — nem demasiado elevada — ao ponto de inviabilizar a deteção de acréscimos de atividade). Deve aplicar-se a cada dispositivo um protocolo normalizado que, tanto quanto possível, assegure a reprodutibilidade entre dispositivos e entre sessões de avaliação. Os grupos expostos devem ser distribuídos pelos vários dispositivos da maneira mais equilibrada possível. Cada animal deve ser avaliado individualmente. Os grupos expostos devem ser distribuídos ao longo de cada sessão, para evitar confusões com os ritmos de atividade circadianos. As variações das condições experimentais devem ser reduzidas ao mínimo e não devem ter nenhuma relação sistemática com a exposição dos animais. Entre as variáveis que podem afetar muitas medições do comportamento, incluindo as da atividade motora, contam-se o nível sonoro, a dimensão e a forma da gaiola de ensaio, a temperatura, a humidade relativa, as condições de luminosidade, os cheiros, a utilização no ensaio da gaiola de alojamento ou de outra gaiola e distrações ambientais.

Funções motoras e sensoriais

36. Devem examinar-se aprofundadamente as funções motoras e sensoriais pelo menos uma vez no período da adolescência e uma vez na idade adulta jovem (por exemplo, 60 a 70 dias após o nascimento). No tocante ao dia do desmame, ver o ponto 32. O número de experiências deve ser suficiente para que se disponha de uma quantidade adequada de amostras dos modos sensoriais (por exemplo, somatossensorial e vestibular) e das funções motoras (por exemplo força e coordenação). Alguns exemplos de testes das funções motoras e sensoriais: resposta ao estiramento (46), reflexo postural labiríntico (47)(48), habituação ao sobressalto auditivo (40)(49)(50)(51)(52)(53)(54) e potenciais evocados (55).

▼M5

Testes de aprendizagem e memória

37. Deve efetuar-se um teste de memória e aprendizagem associativa depois do desmame (por exemplo 25 ± 2 dias após o nascimento) e a adultos jovens (60 ou mais dias após o nascimento). No tocante ao dia do desmame, ver o ponto 32. Podem utilizar-se o mesmo teste ou testes distintos nestes dois estádios de desenvolvimento. Existe uma certa flexibilidade na escolha do teste ou testes de aprendizagem e de memória a realizar nos ratos recentemente desmamados e nos ratos adultos, mas o(s) teste(s) escolhido(s) deve(m) satisfazer dois critérios. O primeiro é que a avaliação da aprendizagem deve ser efetuada em termos das alterações ocorridas ao longo de diversas experiências, ou sessões, repetidas de aprendizagem ou, caso o teste compreenda uma única experiência, relativamente a uma condição que controle os efeitos não associativos do treino. O segundo é que o teste ou testes devem compreender uma medição da memória (de curto ou de longo prazo) além da aprendizagem inicial (aquisição), mas esta medição da memória só deve ser incluída no relatório se for acompanhada de uma medição da aquisição obtida no mesmo teste. Se o teste ou testes de aprendizagem e memória revelar(em) efeitos do produto químico em estudo, importa ponderar a realização de outros testes, que permitam excluir qualquer interpretação fundada em alterações das capacidades sensoriais, de motivação e/ou motoras. Além destes dois critérios, recomenda-se que a escolha do teste de aprendizagem e memória se baseie na sensibilidade comprovada do mesmo à classe de produtos químicos em estudo, se tal informação estiver disponível nas fontes bibliográficas. Na falta dessa informação, seguem-se alguns exemplos de testes que podem satisfazer os critérios referidos: evitação passiva (43)(56)(57), adaptação espacial retardada no rato adulto (58) e no rato não desmamado (59), condicionamento olfativo (43)(60), labirinto aquático de Morris (61)(62)(63), labirinto de Biel ou de Cincinnati (64)(65), labirinto de braços radiais (66), labirinto em T (43) e aquisição e conservação de comportamentos programados (26)(67)(68). As referências bibliográficas descrevem outros testes para ratos recentemente desmamados (26)(27) e ratos adultos (19)(20).

Autópsia

38. As progenitoras podem ser eutanasiadas depois do desmame da progenitura.

39. Procede-se à avaliação neuropatológica da progenitura utilizando tecidos de animais eutanasiados 22 dias após o nascimento ou anteriormente, entre 11 e 22 dias após o nascimento, bem como no termo do estudo. No caso da progenitura eutanasiada até 22 dias após o nascimento, inclusive, examinam-se tecidos cerebrais. No caso dos animais eutanasiados no termo do estudo, examinam-se tecidos do sistema nervoso central e tecidos do sistema nervoso periférico. Os animais eutanasiados até 22 dias após o nascimento, inclusive, podem ser fixados por imersão ou perfusão. Os animais eutanasiados no termo do estudo devem ser fixados por perfusão. Todos os aspetos da preparação das amostras de tecidos, desde a perfusão dos animais à dissecação das amostras, ao tratamento dos tecidos e à coloração das lâminas devem inserir-se num modelo experimental equilibrado, em que cada lote contenha amostras representativas de cada grupo de dosagem. O documento de orientações n.º 20 (9) contém mais orientações sobre neuropatologias; ver igualmente a referência 103.

Tratamento das amostras de tecidos

40. Devem registar-se todas as anomalias macroscópicas detetadas na autópsia. As amostras de tecidos colhidas devem representar as principais regiões do sistema nervoso. As amostras de tecidos devem ser conservadas num fixador adequado e ser tratadas segundo protocolos histológicos normalizados já publicados (69)(70)(71)(103). A incorporação em parafina é aceitável para tecidos do sistema nervoso central e do sistema nervoso periférico. Se for necessária maior resolução (por exemplo no caso dos nervos periféricos, quando se suspeite de neuropatias periféricas, ou para a análise

▼M5

morfométrica de nervos periféricos), pode ser melhor utilizar ósmio na pós-fixação, juntamente com a incorporação numa resina epoxídica. Os tecidos cerebrais colhidos para análises morfométricas devem ser incorporados num meio adequado ao mesmo tempo para todos os níveis de dosagem, a fim de evitar os erros de contração por vezes decorrentes da conservação prolongada em fixadores (6).

Exame neuropatológico

41. Os objetivos deste exame qualitativo são os seguintes:

i) Identificar as regiões do sistema nervoso que evidenciam alterações neuropatológicas;

ii) Identificar os tipos de alterações neuropatológicas resultantes da exposição ao produto químico em estudo;

iii) Determinar a gravidade das alterações neuropatológicas.

Um patologista convenientemente formado deve examinar ao microscópio cortes histológicos representativos das amostras de tecidos, a fim de detetar alterações neuropatológicas. Deve ser atribuído a cada uma dessas alterações um grau subjetivo de gravidade. A coloração com hematoxilina e eosina pode ser suficiente para o exame dos cortes cerebrais de animais eutanasiados até 22 dias após o nascimento, inclusive. No entanto, para examinar cortes de tecidos dos sistemas nervosos central e periférico de animais eutanasiados no termo do estudo, recomenda-se a coloração da mielina (por exemplo, com azul rápido de luxol/violeta de cresilo) e uma coloração com prata (por exemplo a coloração de Bielschowsky ou de Bodians). Cabe ao patologista avaliar, com base na sua experiência profissional e no tipo das alterações observadas, se é conveniente utilizar outros tipos de coloração para identificar e caracterizar determinados tipos de alterações — por exemplo proteína ácida fibrilar glial (GFAP) ou histoquímica da lecitina para examinar alterações gliais e microgliais (72), fluoro-jade para deteção de necroses (73)(74) ou colorações com prata específicas da degenerescência neural (75).

42. Deve efetuar-se uma avaliação morfométrica (quantitativa), pois esses dados podem contribuir para detetar efeitos da exposição e são úteis na interpretação das diferenças no peso cerebral ou morfológicas devidas à exposição (76)(77). Devem colher-se amostras dos tecidos nervosos e os tecidos devem ser preparados para esta avaliação. As avaliações morfométricas podem compreender, por exemplo, medições lineares ou da superfície de determinadas regiões do cérebro (78). Ambos os tipos de medições devem ser praticados em cortes homólogos cuidadosamente selecionados com base em localizadores microscópicos fiáveis (6). O recurso à estereologia pode permitir identificar efeitos da exposição em parâmetros como o volume ou o número de células de determinadas regiões neuroanatómicas (79)(80)(81)(82)(83)(84).

43. Devem examinar-se os cérebros para localizar eventuais indícios de alterações neuropatológicas relacionadas com a exposição, colhendo amostras adequadas das principais regiões cerebrais — por exemplo, bolbos olfativos, córtex cerebral, hipocampo, núcleos da base, tálamo, hipotálamo, mesencéfalo (teto, tegumento e pedúnculos cerebrais), protuberância anelar, bolbo raquidiano, cerebelo) — para assegurar um exame aprofundado. É importante que os cortes sejam efetuados no mesmo plano em todos os animais. Devem constituir-se amostras representativas de cortes da medula espinal e do sistema nervoso periférico dos animais adultos eutanasiados no termo do estudo. As zonas examinadas devem compreender os olhos, com o nervo ótico e a retina, a medula espinal, ao nível das dilatações cervical e lombar, fibras das raízes dorsal e ventral, o nervo ciático proximal, o nervo tibial proximal (ao nível do joelho) e as ramificações do nervo tibial ao nível dos músculos da barriga da perna. Devem ser examinados cortes transversais e longitudinais da medula espinal e dos nervos periféricos.

▼M5

44. A avaliação neuropatológica deve compreender um exame com vista à deteção de indícios de alterações do desenvolvimento do sistema nervoso (6)(85)(86)(87)(88)(89), além das alterações ao nível celular (por exemplo vacuolização neuronal, degeneração ou necrose) e dos tecidos (por exemplo gliose, infiltração leucocitária ou formação de quistos). Para isto, é importante distinguir os efeitos relacionados com a exposição, por um lado, das ocorrências reconhecidamente normais do desenvolvimento no estádio correspondente à idade do animal no momento da eutanásia, por outro (90). Seguem-se alguns exemplos de alterações significativas indicadoras de que o desenvolvimento foi prejudicado:

— alterações das dimensões ou da forma dos bolbos olfativos, dos hemisférios cerebrais ou do cerebelo;

— alterações das dimensões relativas das diversas regiões do cérebro, designadamente aumento ou diminuição das dimensões de regiões em consequência da perda ou da persistência de populações normalmente transitórias de células ou de projeções axónicas (por exemplo camada germinal externa do cerebelo, corpo caloso);

— alterações de proliferação, migração ou diferenciação reveladas por zonas de apoptose ou necrose excessivas, agregados ou populações dispersas de neurões etópicos, mal orientados ou mal formados ou alterações das dimensões relativas das diversas camadas das estruturas corticais;

— alterações dos padrões de mielinização, nomeadamente redução dimensional global ou alterações da coloração das estruturas mielinizadas;

— indícios de hidrocefalia, nomeadamente dilatação ventricular, estenose do aqueduto cerebral e emagrecimento dos hemisférios cerebrais.

Análise da relação entre as alterações neuropatológicas e a dosagem

45. Recomenda-se o seguinte protocolo sequencial para os exames neuropatológicos qualitativos e quantitativos: Começa-se por comparar cortes do grupo exposto à dose mais elevada com cortes do grupo de controlo. Se não se detetarem indícios de alterações neuropatológicas nos animais do grupo exposto à dose mais elevada, não são necessários mais exames. Caso se detetem alterações neuropatológicas nesse grupo, examinam-se animais dos grupos expostos às doses intermédia e mais baixa. Se o estudo do grupo exposto à dose mais elevada for interrompido devido à morte dos animais ou a efeitos tóxicos não relacionados com a exposição ao produto químico em estudo, devem examinar-se os grupos expostos à dose mais elevada e à dose intermédia para verificar se existem alterações neuropatológicas. Se forem detetados indícios de neurotoxicidade nos grupos expostos às doses mais baixas, esses grupos devem ser objeto de exames neuropatológicos. Se, nos exames qualitativos ou quantitativos, for detetada alguma alteração neuropatológica relacionada com a exposição ao produto químico em estudo, deve determinar-se, com base na avaliação de todos os animais de todos os grupos de dosagem, a relação entre a dose e a incidência, frequência e gravidade das lesões ou das alterações morfométricas. Esta avaliação deve incidir em todas as regiões do cérebro que evidenciem alguma alteração neuropatológica. Para cada tipo de lesão, devem descrever-se as características em que se baseiam os vários graus de gravidade, indicando os critérios utilizados para os diferenciar. Devem ser registados a frequência de cada tipo de lesão e o respetivo grau de gravidade e deve ser efetuada uma análise estatística de avaliação da natureza da resposta à dosagem. Recomenda-se o uso de lâminas codificadas (91).

DADOS E RELATÓRIOS

Dados

46. Os dados devem ser individualizados e também resumidos em quadros, indicando, para cada grupo estudado, os tipos de alterações e o número de progenitoras, progenitura, por sexo, e ninhadas que apresentam cada tipo de alteração. Caso se tenha procedido à exposição pós-natal direta da progenitura, devem indicar-se a via, a duração e o período de exposição.

▼M5

Avaliação e interpretação dos resultados

47. O objetivo dos estudos de neurotoxicidade durante o desenvolvimento é fornecer informações sobre os efeitos da exposição repetida ao produto químico durante o desenvolvimento intrauterino e pós-natal. Uma vez que o estudo incide tanto na toxicidade geral como na neurotoxicidade durante o desenvolvimento, os resultados obtidos permitem estabelecer uma distinção entre efeitos neurotóxicos durante o desenvolvimento não associados a toxicidade materna em geral e efeitos neurotóxicos durante o desenvolvimento apenas induzidos a níveis também tóxicos para as progenitoras. Em virtude da complexidade das interdependências entre o modelo do estudo, a análise estatística e o significado biológico dos dados, a interpretação correta de dados de neurotoxicidade durante o desenvolvimento exige a apreciação de um especialista na matéria (107)(109). A interpretação dos resultados dos ensaios deve basear-se na ponderação da suficiência da prova (20)(92)(93)(94). Devem discutir-se os tipos de efeitos comportamentais ou morfológicos eventualmente observados, bem como os indícios de uma relação entre a dose e a resposta. Esta caracterização deve ter em conta os dados de todos os estudos disponíveis pertinentes para a avaliação da neurotoxicidade durante o desenvolvimento, nomeadamente estudos epidemiológicos no ser humano ou relatórios de casos paradigmáticos, bem como estudos experimentais em animais (por exemplo, dados toxicocinéticos, informações de relações estrutura-atividade e dados de outros estudos de toxicidade). Deve igualmente ser contemplada a relação entre as doses do produto químico em estudo e a presença, ausência, incidência e intensidade dos eventuais efeitos neurotóxicos em cada sexo (20)(95).

48. A avaliação dos dados deve compreender uma discussão do significado biológico e do significado estatístico. A análise estatística deve ser entendida como um instrumento mais orientador do que determinante na interpretação dos dados. A falta de significado estatístico não deve ser o único fundamento para concluir pela ausência de efeitos ligados à exposição, tal como a existência de significado estatístico não deve constituir a única justificação para concluir pela ocorrência de efeitos ligados à exposição. Para evitar resultados falsos negativos e as dificuldades inerentes à demonstração de resultados negativos, devem incluir-se na discussão dados históricos de controlo e dados de controlo positivos, sobretudo se não ocorrerem efeitos relacionados com a exposição (102)(106). A probabilidade da obtenção de resultados falsos positivos deve ser discutida no âmbito da avaliação estatística geral dos resultados (96). A avaliação deve abranger a relação eventualmente existente entre as alterações neuropatológicas e comportamentais observadas.

49. Os resultados devem ser todos analisados com base em modelos estatísticos adaptados ao modelo experimental (108). A opção por uma análise paramétrica ou não-paramétrica deve fundamentar-se na ponderação de fatores como a natureza dos dados (transformados ou não) e a distribuição dos mesmos, assim como na robustez relativa da análise estatística escolhida. O objetivo e o modelo do estudo devem orientar a escolha de uma análises estatística que minimize os erros do tipo I (falsos positivos) e do tipo II (falsos negativos) (96)(97)(104)(105). Nos estudos do desenvolvimento em espécies multíparas nos quais se estudem várias crias por ninhada, o modelo estatístico deve incluir a ninhada, para evitar uma inflação de erros do tipo I (98)(99)(100)(101). A unidade de medida estatística deve ser a ninhada e não a cria e as experiências devem ser concebidas de modo que crias da mesma ninhada não sejam consideradas observações independentes. Os parâmetros que sejam medidos várias vezes no mesmo sujeito devem ser analisados por recurso a modelos estatísticos que tenham em conta o facto de essas medições não serem independentes.

Relatório dos ensaios

50. Elementos a constar do relatório dos ensaios:

Produto químico em estudo:

— natureza física e propriedades físico-químicas pertinentes;

— dados de identificação, incluindo a proveniência;

▼M5

— grau de pureza da preparação e impurezas conhecidas e/ou previsíveis.

Veículo (se for o caso):

— justificação da escolha do veículo, se não for água nem soro fisiológico.

Animais estudados:

— espécie e estirpe utilizadas e, caso não sejam utilizados ratos, justificação da utilização de outra espécie;

— fornecedor dos animais;

— número, idade no início do estudo e sexo dos animais;

— proveniência, condições de alojamento, dieta, água de beber, etc.;

— peso de cada animal no início do ensaio.

Condições de realização dos ensaios:

— fundamentação da escolha das doses;

— fundamentação da via e do período de administração;

— caracterização das doses administradas, incluindo elementos sobre o veículo, o volume e a forma física do administrado;

— elementos relativos à formulação do produto químico em estudo/à incorporação do mesmo na dieta dos animais; concentração atingida, estabilidade e homogeneidade da preparação;

— método utilizado para identificar individualmente as progenitoras e a progenitura;

— descrição pormenorizada do(s) protocolo(s) de aleatorização utilizados para integrar as progenitoras nos grupos expostos, selecionar as crias a eliminar das ninhadas e integrar as crias restantes nos grupos estudados;

— elementos relativos à administração do produto químico em estudo;

— se aplicável, equivalência entre a concentração do produto químico em estudo na dieta/na água de beber ou inalado, expressa em ppm, e a dose real, expressa em mg/kg de peso corporal/dia;

— condições ambientais;

— elementos relativos à qualidade dos alimentos e da água (por exemplo, da torneira ou destilada);

— datas de início e termo do estudo.

Protocolos de exame e protocolos experimentais:

— descrição pormenorizada dos protocolos utilizados para normalizar exames e protocolos; definições utilizadas na pontuação das observações;

— lista dos protocolos experimentais utilizados e justificação da escolha dos mesmos;

— elementos relativos aos protocolos comportamentais/funcionais, patológicos, neuroquímicos e eletrofisiológicos utilizados, incluindo informações e demais elementos sobre os aparelhos automáticos;

— protocolos de calibração e de verificação da equivalência dos aparelhos utilizados; protocolos utilizados para garantir o equilíbrio dos grupos expostos na execução experimental;

— breve justificação das eventuais decisões fundamentadas na experiência profissional.

▼M5

Resultados (individualizados e resumidos, incluindo a média e a variância, quando se justifique):

— número de animais no início do estudo e número de animais no final do estudo;

— número de animais e de ninhadas utilizados em cada método de ensaio;

— número de identificação de cada animal e da ninhada de que provém;

— número de animais e peso médio por sexo à nascença, de cada ninhada;

— peso corporal e alterações de peso corporal, incluindo o peso corporal das progenitoras e da progenitura no termo dos ensaios;

— dados do consumo de alimentos e, se pertinente, do consumo de água (por exemplo se o produto químico em estudo for administrado pela água de beber);

— dados das respostas tóxicas por sexo e por nível de dosagem, incluindo sinais de toxicidade ou mortalidade (e, se for o caso, o momento e a causa da morte);

— natureza, gravidade, duração, dia do aparecimento, hora do dia e evolução ulterior das observações dos exames clínicos aprofundados;

— pontuação de cada indicador de desenvolvimento (peso, maturidade sexual e ontogenia comportamental) em cada ocasião de observação;

— descrição pormenorizada das observações comportamentais, funcionais, neuropatológicas, neuroquímicas e eletrofisiológicas efetuadas, por sexo, incluindo os acréscimos e as reduções em relação ao(s) grupo(s) de controlo;

— resultados das autópsias;

— pesos cerebrais;

— diagnósticos decorrentes dos sinais e lesões neurológicos, incluindo doenças ou estados naturais;

— imagens de observações representativas;

— imagens pouco aumentadas que permitiram aferir da homologia dos cortes utilizados para a morfometria;

— dados de absorção e metabólicos, incluindo dados complementares de estudos toxicocinéticos realizados separadamente, se disponíveis;

— tratamento estatístico dos resultados (incluindo os modelos estatísticos utilizados para analisar os dados) e resultados, sejam estes significativos ou não;

— lista do pessoal participante no estudo, incluindo a respetiva formação profissional.

Discussão dos resultados:

— informações relativas à relação entre a dose e a resposta, por sexo e por grupo;

— relação entre quaisquer outros efeitos tóxicos e as conclusões acerca do potencial neurotóxico do produto químico em estudo, por sexo e por grupo;

— influência de eventuais informações toxicocinéticas nas conclusões;

— similitude de efeitos com os de qualquer neurotóxico conhecido;

▼M5

— dados corroborantes da fiabilidade e sensibilidade do método de ensaio (dados históricos de controlo e dados de controlo positivos);

— eventuais relações entre efeitos neuropatológicos e funcionais;

— nível sem observação de efeitos adversos (NOAEL) ou doses de referência para as progenitoras e a progenitura, por sexo e por grupo.

Conclusões:

— discussão da interpretação geral dos dados com base nos resultados, incluindo o NOAEL e uma conclusão sobre a neurotoxicidade, ou não, durante o desenvolvimento, do produto químico em estudo.

REFERÊNCIAS

1. OCDE (1995). Draft Report of the OECD *Ad Hoc* Working Group on Reproduction and Developmental Toxicity. Copenhaga, Dinamarca, 13 e 14 de junho de 1995.

2. US EPA (1998). U.S. Environmental Protection Agency Health Effects Test Guidelines. OPPTS 870.6300. Developmental Neurotoxicity Study. US EPA 712-C-98-239. Acessível em: http://www.epa.gov/opptsfrs/OPPTS_Harmonized/870_Health_Effects_Test_Guidelines/Series/

3. US EPA (1998). Guidelines for Neurotoxicity Risk Assessment. US EPA 630/R-95/001F. Acessível em: http://cfpub.epa.gov/ncea/cfm/recordisplay.cfm?PrintVersion=True&deid=12479

4. Cory-Slechta, D.A., Crofton, K.M., Foran, J.A., Ross, J.F., Sheets, L.P., Weiss, B., Mileson, B. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: I. Behavioral effects. *Environ. Health Perspect.* 109:79-91.

5. Dorman, D.C., Allen, S.L., Byczkowski, J.Z., Claudio, L., Fisher, J.E. Jr., Fisher, J.W., Harry, G.J., Li, A.A., Makris, S.L., Padilla, S., Sultatos, L.G., Mileson, B.E. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: III. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. *Environ. Health Perspect.* 109:101-111.

6. Garman, R.H., Fix, A.S., Jortner, B.S., Jensen, K.F., Hardisty, J.F., Claudio, L., Ferenc, S. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: II. Neuropathology. *Environ. Health Perspect.* 109:93-100.

7. OCDE (2003). Report of the OECD Expert Consultation Meeting on Developmental Neurotoxicity Testing. Washington D.C., EUA, 23 a 25 de outubro de 2000.

8. OCDE (2008). OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 43. Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment Directorate, OCDE, Paris, julho de 2008. Acessível em: http://search.oecd.org/officialdocuments//displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(200816&doclanguage=en)

9. OCDE (2003). OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 20. Guidance Document for Neurotoxicity Testing. Environment Directorate, OCDE, Paris, setembro de 2003. Acessível em: http://www.oecd.org/document/22/0,2340,en_2649_34377_1916054_1_1_1_1,00.html

10. Kimmel, C.A., Rees, D.C., Francis, E.Z. (1990). Qualitative and quantitative comparability of human and animal developmental neurotoxicity. *Neurotoxicol. Teratol.* 12:173-292.

11. Spencer, P.S., Schaumburg, H.H., Ludolph, A.C. (2000). Experimental and Clinical Neurotoxicology, 2.ª edição, ISBN 0195084772. Oxford University Press, Nova Iorque.

▼**M5**

12. Mendola, P., Selevan, S.G., Gutter, S., Rice, D. (2002). Environmental factors associated with a spectrum of neurodevelopmental deficits. *Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.* 8:188-197.

13. Slikker, W.B., Chang, L.W. (1998). Handbook of Developmental Neurotoxicology, 1.ª edição, ISBN 0126488606. Academic Press, Nova Iorque.

14. Capítulo B.34 deste anexo: Teste de toxicidade sobre a reprodução em uma geração.

15. Capítulo B.35 deste anexo: Estudo de toxicidade sobre a reprodução em duas gerações.

16. Capítulo B.43 deste anexo: Estudo de neurotoxicidade em roedores.

17. Capítulo B.31 deste anexo: Estudo de toxicidade sobre o desenvolvimento pré-natal.

18. Diretiva 2010/63/UE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 22 de setembro de 2010, relativa à proteção dos animais utilizados para fins científicos (JO L 276 de 20.10.2010, p. 33).

19. OMS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals (Environmental Health Criteria 60). Albany, Nova Iorque: World Health Organization Publications Center, EUA. Acessível em: http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc060.htm

20. OMS (2001). Neurotoxicity Risk Assessment for Human Health:Principles and Approaches (Environmental Health Criteria 223). World Health Organization Publications, Genebra. Acessível em: http://www.intox.org/databank/documents/supplem/supp/ehc223.htm

21. Chang, L.W., Slikker, W. (1995). Neurotoxicology:Approaches and Methods, 1.ª edição, ISBN 012168055X. Academic Press, Nova Iorque.

22. De Cabo, C., Viveros, M.P. (1997). Effects of neonatal naltrexone on neurological and somatic development in rats of both genders. *Neurotoxicol. Teratol.* 19:499-509.

23. Agnish, N.D., Keller, K.A. (1997). The rationale for culling of rodent litters. *Fundam. Appl. Toxicol.* 38:2-6.

24. Avery, D.L., Spyker, J.M. (1977). Foot tattoo of neonatal mice. *Lab. Animal Sci.* 27:110-112.

25. Wier, P.J., Guerriero, F.J., Walker, R.F. (1989). Implementation of a primary screen for developmental neurotoxicity. *Fundam. Appl. Toxicol.* 13:118-136.

26. Spear, N.E., Campbell, B.A. (1979). Ontogeny of Learning and Memory. ISBN 0470268492. Erlbaum Associates, New Jersey.

27. Krasnegor, N.A., Blass, E.M., Hofer, M.A., Smotherman, W. (1987). Perinatal Development:A Psychobiological Perspective. Academic Press, Orlando.

28. Zoetis, T., Walls, I. (2003). Principles and Practices for Direct Dosing of Pre-Weaning Mammals in Toxicity Testing and Research. ILSI Press, Washington, DC.

29. Moser, V., Walls, I., Zoetis, T. (2005). Direct dosing of preweaning rodents in toxicity testing and research: Deliberations of an ILSI RSI expert working group. *Int. J. Toxicol.* 24:87-94.

30. Conolly, R.B., Beck, B.D., Goodman, J.I. (1999). Stimulating research to improve the scientific basis of risk assessment. *Toxicol. Sci.* 49:1-4.

31. ICH (1993). ICH Harmonised Tripartite Guideline: Detection of Toxicity to Reproduction for Medical Products (S5A). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Phamaceuticals for Human Use.

32. Lochry, E.A. (1987). Concurrent use of behavioral/functional testing in existing reproductive and developmental toxicity screens: Practical considerations. *J. Am. Coll. Toxicol.* 6:433-439.

▼**M5**

33. Tachibana, T., Narita, H., Ogawa, T., Tanimura, T. (1998). Using postnatal age to determine test dates leads to misinterpretation when treatments alter gestation length, results from a collaborative behavioral teratology study in Japan. *Neurotoxicol. Teratol.* 20:449-457.

34. Gallavan, R.H. Jr., Holson, J.F., Stump, D.G., Knapp, J.F., Reynolds, V.L. (1999). Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: potential for confounding effects of progeny body weights. *Reprod. Toxicol.* 13:383-390.

35. Gray, L.E. Jr., Ostby, J., Furr, J., Price, M., Veeramachaneni, D.N., Parks, L. (2000). Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat. *Toxicol. Sci.* 58:350-365.

36. Adams, J., Buelke-Sam, J., Kimmel, C.A., Nelson, C.J., Reiter, L.W., Sobotka, T.J., Tilson, H.A., Nelson, B.K. (1985). Collaborative behavioral teratology study: Protocol design and testing procedure. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* 7:579-586.

37. Korenbrot, C.C., Huhtaniemi, I.T., Weiner, R.W. (1977). Preputial separation as an external sign of pubertal development in the male rat. *Biol. Reprod.* 17:298-303.

38. Spear, L.P. (1990). Neurobehavioral assessment during the early postnatal period. *Neurotoxicol. Teratol.* 12:489-95.

39. Altman, J., Sudarshan, K. (1975). Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. *Anim. Behav.* 23:896-920.

40. Adams, J. (1986). Methods in Behavioral Teratology. Em: Handbook of Behavioral Teratology. Riley, E.P., Vorhees, C.V. (editores) Plenum Press, Nova Iorque, p. 67-100.

41. Reiter, L.W., MacPhail, R.C. (1979). Motor activity: A survey of methods with potential use in toxicity testing. *Neurobehav. Toxicol.* 1:53-66.

42. Robbins, T.W. (1977). A critique of the methods available for the measurement of spontaneous motor activity, Handbook of Psychopharmacology, volume 7. Iverson, L.L., Iverson, D.S., Snyder, S.H. (editores). Plenum Press, Nova Iorque, p. 37-82.

43. Crofton, K.M., Peele, D.B., Stanton, M.E. (1993). Developmental neurotoxicity following neonatal exposure to 3,3'-iminodipropionitrile in the rat. *Neurotoxicol. Teratol.* 15:117-129.

44. Ruppert, P.H., Dean, K.F., Reiter, L.W. (1985). Development of locomotor activity of rat pups in figure-eight mazes. *Dev. Psychobiol.* 18:247-260.

45. Crofton, K.M., Howard, J.L., Moser, V.C., Gill, M.W., Reiter, L.W., Tilson, H.A., MacPhail, R.C. (1991). Interlaboratory comparison of motor activity experiments: Implications for neurotoxicological assessments. *Neurotoxicol. Teratol.* 13:599-609.

46. Ross, J.F., Handley, D.E., Fix, A.S., Lawhorn, G.T., Carr, G.J. (1997). Quantification of the hind-limb extensor thrust response in rats. *Neurotoxicol. Teratol.* 19:1997.405-411.

47. Handley, D.E., Ross, J.F., Carr, G.J. (1998). A force plate system for measuring low-magnitude reaction forces in small laboratory animals. *Physiol. Behav.* 64:661-669.

48. Edwards, P.M., Parker, V.H. (1977). A simple, sensitive, and objective method for early assessment of acrylamide neuropathy in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 40:589-591.

49. Davis, M. (1984). The mammalian startle response. Em: Neural Mechanisms of Startle Behavior. Eaton, R.C. (editores). Plenum Press, Nova Iorque, p. 287-351.

50. Koch, M. (1999). The neurobiology of startle. *Prog. Neurobiol.* 59:107--128.

51. Crofton, K.M. (1992). Reflex modification and the assessment of sensory dysfunction. Em: Target Organ Toxicology Series:Neurotoxicology. Tilson, H., Mitchell, C. (editores). Raven Press, Nova Iorque, p. 181-211.

▼**M5**

52. Crofton, K.M., Sheets, L.P. (1989). Evaluation of sensory system function using reflex modification of the startle response. *J. Am. Coll. Toxicol.* 8:199-211.

53. Crofton, K.M, Lassiter, T.L, Rebert, C.S. (1994). Solvent-induced ototoxicity in rats: An atypical selective mid-frequency hearing deficit. *Hear. Res.* 80:25-30.

54. Ison, J.R. (1984). Reflex modification as an objective test for sensory processing following toxicant exposure. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* 6:437–445.

55. Mattsson, J.L., Boyes, W.K., Ross, J.F. (1992). Incorporating evoked potentials into neurotoxicity test schemes. Em: *Target Organ Toxicology Series:* Neurotoxicity. Tilson, H., Mitchell, C., (editores). Raven Press, Nova Iorque. p. 125-145.

56. Peele, D.B., Allison, S.D., Crofton, K.M. (1990). Learning and memory deficits in rats following exposure to 3,3'-iminopropionitrile. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 105:321-332.

57. Bammer, G. (1982). Pharmacological investigations of neurotransmitter involvement in passive avoidance responding: A review and some new results. *Neurosci. Behav. Rev.* 6:247-296.

58. Bushnell, P.J. (1988). Effects of delay, intertrial interval, delay behavior and trimethyltin on spatial delayed response in rats. *Neurotoxicol. Teratol.* 10:237-244.

59. Green, R.J., Stanton, M.E. (1989). Differential ontogeny of working memory and reference memory in the rat. *Behav. Neurosci.* 103:98-105.

60. Kucharski, D., Spear, N.E. (1984). Conditioning of aversion to an odor paired with peripheral shock in the developing rat. *Develop. Psychobiol.* 17:465-479.

61. Morris, R. (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci. Methods* 11:47-60.

62. Brandeis, R., Brandys, Y., Yehuda, S. (1989). The use of the Morris water maze in the study of memory and learning. *Int. J. Neurosci.* 48:29-69.

63. D'Hooge, R., De Deyn, P.P. (2001). Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res. Rev.* 36:60-90.

64. Vorhees, C.V. (1987). Maze learning in rats: A comparison of performance in two water mazes in progeny prenatally exposed to different doses of phenytoin. *Neurotoxicol. Teratol.* 9:235-241.

65. Vorhees, C.V. (1997). Methods for detecting long-term CNS dysfunction after prenatal exposure to neurotoxins. *Drug Chem. Toxicol.* 20:387-399.

66. Akaike, M., Tanaka, K., Goto, M., Sakaguchi, T. (1988). Impaired Biel and Radial arm maze learning in rats with methyl-nitrosurea induced microcephaly. *Neurotoxicol. Teratol.* 10:327-332.

67. Cory-Slechta, D.A., Weiss, B., Cox, C. (1983). Delayed behavioral toxicity of lead with increasing exposure concentration. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 71:342-352.

68. Campbell, B.A., Haroutunian, V. (1981). Effects of age on long-term memory: Retention of fixed interval responding. *J. Gerontol.* 36:338-341.

69. Fix, A.S, Garman, R.H. (2000). Practical aspects of neuropathology: A technical guide for working with the nervous system. *Toxicol. Pathol.* 28:122-131.

70. Prophet, E.B., Mills, B., Arrington, J.B., Sobin, L.H. (1994). Laboratory Methods in Histotechnology. American Registry of Pathology, Washington, DC, p. 84-107.

71. Bancroft, J.D., Gamble, M. (2002). Theory and Practice of Histological Techniques, 5.ª edição. Churchill Livingstone, Londres.

▼M5

72. Fix, A.S., Ross, J.F., Stitzel, S.R., Switzer, R.C. (1996). Integrated evaluation of central nervous system lesions: stains for neurons, astrocytes, and microglia reveal the spatial and temporal features of MK-801-induced neuronal necrosis in the rat cerebral cortex. *Toxicol. Pathol.* 24:291-304.

73. Schmued, L.C., Hopkins, K.J. (2000). Fluoro-Jade B: A high affinity tracer for the localization of neuronal degeneration. *Brain Res.* 874:123-130.

74. Krinke, G.J., Classen, W., Vidotto, N., Suter, E., Wurmlin, C.H. (2001). Detecting necrotic neurons with fluoro-jade stain. *Exp. Toxic. Pathol.* 53:365-372.

75. De Olmos, I.S., Beltramino, C.A., de Olmos de Lorenzo, S. (1994). Use of an amino-cupric-silver technique for the detection of early and semiacute neuronal degeneration caused by neurotoxicants, hypoxia and physical trauma. *Neurotoxicol. Teratol.* 16, 545-561.

76. De Groot, D.M.G., Bos-Kuijpers, M.H.M., Kaufmann, W.S.H., Lammers, J.H.C.M., O'Callaghan, J.P., Pakkenberg, B., Pelgrim, M.T.M., Waalkens-Berendsen, I.D.H., Waanders, M.M., Gundersen, H.J. (2005a). Regulatory developmental neurotoxicity testing: A model study focusing on conventional neuropathology endpoints and other perspectives. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 19:745-755.

77. De Groot, D.M.G., Hartgring, S., van de Horst, L., Moerkens, M., Otto, M., Bos-Kuijpers, M.H.M., Kaufmann, W.S.H., Lammers, J.H.C.M., O'Callaghan, J.P., Waalkens-Berendsen, I.D.H., Pakkenberg, B., Gundersen, H.J. (2005b). 2D and 3D assessment of neuropathology in rat brain after prenatal exposure to methylazoxymethanol, a model for developmental neurotoxicity. *Reprod. Toxicol.* 20:417-432.

78. Rodier, P.M., Gramann, W.J. (1979). Morphologic effects of interference with cell proliferation in the early fetal period. *Neurobehav. Toxicol.* 1:129--135.

79. Howard, C.V., Reed, M.G. (1998). Unbiased Stereology:Three-Dimensional Measurement in Microscopy. Springer-Verlag, Nova Iorque.

80. Hyman, B.T., Gomez-Isla, T., Irizarry, M.C. (1998). Stereology: A practical primer for neuropathology. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 57:305-310.

81. Korbo, L., Andersen, B.B., Ladefoged, O., Møller, A. (1993). Total numbers of various cell types in rat cerebellar cortex estimated using an unbiased stereological method. *Brain Res.* 609:262-268.

82. Schmitz, C. (1997). Towards more readily comprehensible procedures in disector stereology. *J. Neurocytol.* 26:707-710.

83. West, M.J. (1999). Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: Issues of precision and bias. *Trends Neurosci.* 22:51--61.

84. Schmitz, C., Hof, P.R. (2005). Design-based stereology in neuroscience. *Neuroscience* 130:813-831.

85. Gavin, C.E., Kates, B., Gerken, L.A., Rodier, P.M. (1994). Patterns of growth deficiency in rats exposed *in utero* to undernutrition, ethanol, or the neuroteratogen methylazoxymethanol (MAM). *Teratology* 49:113-121.

86. Ohno, M., Aotani, H., Shimada, M. (1995). Glial responses to hypoxic/ /ischemic encephalopathy in neonatal rat cerebrum. *Develop. Brain Res.* 84:294-298.

87. Jensen K.F., Catalano S.M. (1998). Brain morphogenesis and developmental neurotoxicology. Em: Handbook of Developmental Neurotoxicology. Slikker, Jr. W., Chang, L.W. (editores). Academic Press, Nova Iorque, p. 3-41.

88. Ikonomidou, C., Bosch, F., Miksa, M., Bittigau, P., Vöckler, J., Dikranian, K., Tenkova, T.I., Stefovska, V., Turski, L., Olney, J.W. (1999). Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science* 283:70-74.

▼**M5**

89. Ikonomidou, C., Bittigau, P., Ishimaru, M.J., Wozniak, D.F., Koch, C., Genz, K., Price, M.T., Sefovska, V., Hörster, F., Tenkova, T., Dikranian, K., Olney, J.W. (2000). Ethanol-induced apoptotic degeneration and fetal alcohol syndrome. *Science* 287:1056-1060.

90. Friede, R. L. (1989). Developmental Neuropathology. Segunda edição. Springer-Verlag, Berlim.

91. House, D.E., Berman, E., Seeley, J.C., Simmons, J.E. (1992). Comparison of open and blind histopathologic evaluation of hepatic lesions. *Toxicol. Let.* 63:127-133.

92. Tilson, H.A., MacPhail, R.C., Crofton, K.M. (1996). Setting exposure standards: a decision process. *Environ. Health Perspect.*, 104:401-405.

93. US EPA (2005). Guidelines for Carcinogen Risk Assessment. US EPA NCEA-F-0644A.

94. US EPA (1996). Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment. Federal Register 61(212):56274-56322.

95. Danish Environmental Protection Agency (1995). Neurotoxicology. Review of Definitions, Methodology, and Criteria. *Miljøprojekt* n.º 282. Ladefoged, O., Lam, H.R., Østergaard, G., Nielsen, E., Arlien-Søborg, P.

96. Muller, K.E., Barton, C.N., Benignus, V.A. (1984). Recommendations for appropriate statistical practice in toxicologic experiments. *Neurotoxicology* 5:113-126.

97. Gad, S.C. (1989). Principles of screening in toxicology with special emphasis on applications to Neurotoxicology. *J. Am. Coll. Toxicol.* 8:21-27.

98. Abby, H., Howard, E. (1973). Statistical procedures in developmental studies on a species with multiple offspring. *Dev. Psychobiol.* 6:329-335.

99. Haseman, J.K., Hogan, M.D. (1975). Selection of the experimental unit in teratology studies. *Teratology* 12:165-172.

100. Holson, R.R., Pearce, B. (1992). Principles and pitfalls in the analysis of prenatal treatment effects in multiparous species. *Neurotoxicol. Teratol.* 14:221-228.

101. Nelson, C.J., Felton, R.P., Kimmel, C.A., Buelke-Sam, J., Adams, J. (1985). Collaborative Behavioral Teratology Study: Statistical approach. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* 7:587-90.

102. Crofton, K.M., Makris, S.L., Sette, W.F., Mendez, E., Raffaele, K.C. (2004). A qualitative retrospective analysis of positive control data in developmental neurotoxicity studies. *Neurotoxicol. Teratol.* 26:345-352.

103. Bolon, B., Garman, R., Jensen, K., Krinke, G., Stuart, B., e um grupo de trabalho *ad hoc* do *Scientific and Regulatory Policy Committee* da STP. (2006). A 'best practices' approach to neuropathological assessment in developmental neurotoxicity testing — for today. *Toxicol. Pathol.* 34:296--313.

104. Tamura, R.N., Buelke-Sam, J. (1992). The use of repeated measures analysis in developmental toxicology studies. *Neurotoxicol. Teratol.* 14(3):205--210.

105. Tukey, J.W., Ciminera, J.L., Heyse, J.F. (1985). Testing the statistical certainty of a response to increasing doses of a drug. *Biometrics* 41:295--301.

106. Crofton, K.M., Foss, J.A., Haas, U., Jensen, K., Levin, E.D., Parker, S.P. (2008). Undertaking positive control studies as part of developmental neurotoxicity testing: report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology* 30(4):266-287.

107. Raffaele, K.C., Fisher, E., Hancock, S., Hazelden, K., Sobrian, S.K. (2008). Determining normal variability in a developmental neurotoxicity test: report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology* 30(4):288-325.

▼**M5**

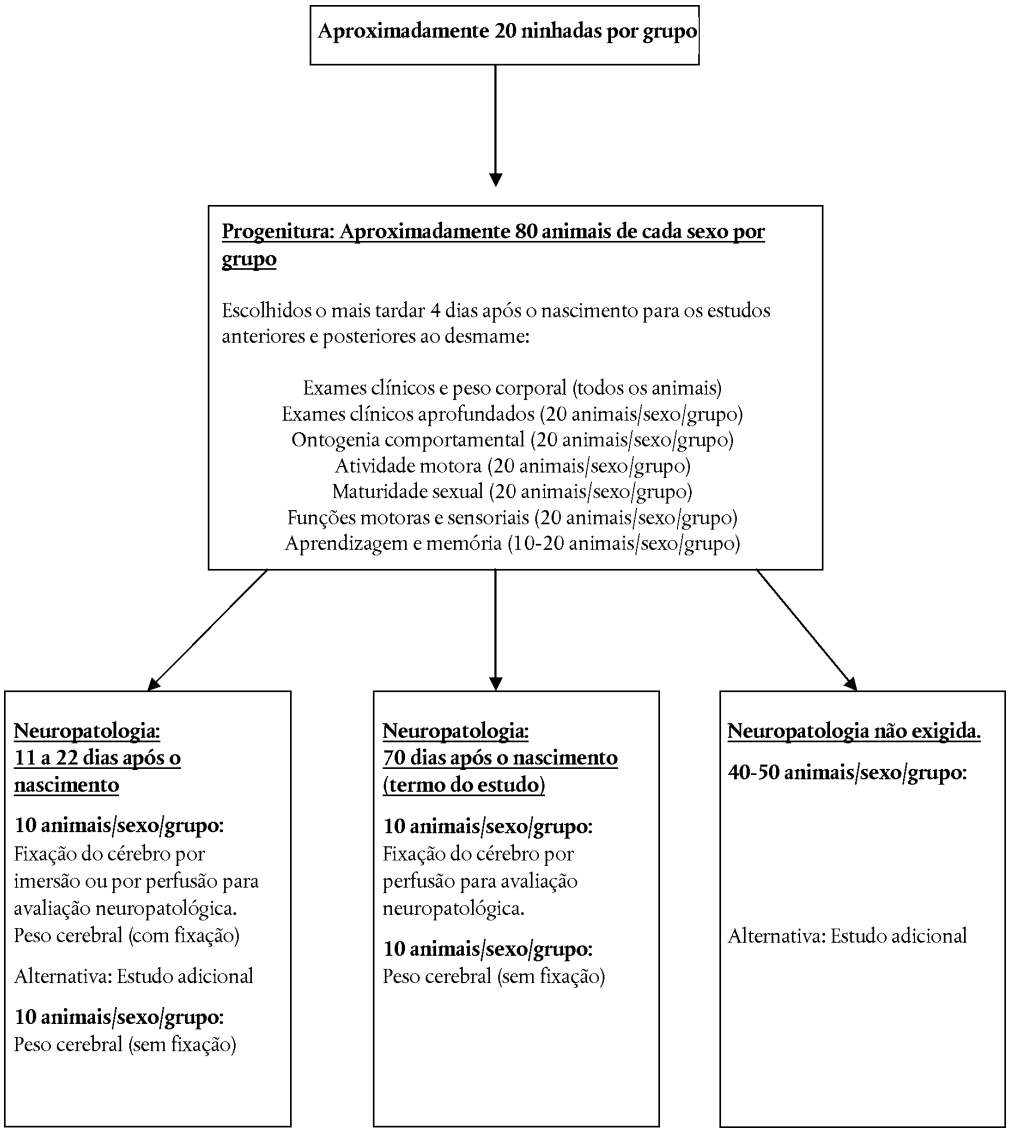
108. Holson, R.R., Freshwater, L., Maurissen, J.P.J., Moser, V.C., Phang, W. (2008). Statistical issues and techniques appropriate for developmental neurotoxicity testing: a report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology* 30(4):326-348.

109. Tyl, R.W., Crofton, K.M., Moretto, A., Moser, V.C., Sheets, L.P., Sobotka, T.J. (2008). Identification and interpretation of developmental neurotoxicity effects: a report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology* 30(4):349-381.

▼M5

Figura 1

Diagrama de resumo dos ensaios funcionais e comportamentais, da avaliação neuropatológica e da pesagem cerebral. Baseia-se na descrição constante dos pontos 13 a 15. O apêndice 1 contém exemplos da repartição dos animais



▼M5

Apêndice 1

1. Descrevem-se a seguir e resumem-se em quadros alguns exemplos de repartição dos animais. Estes exemplos visam ilustrar que os animais estudados podem ser integrados de diversas maneiras nos vários modelos de ensaio.

Exemplo 1

2. Utilizam-se 20 crias de cada sexo por nível de dose (um macho e uma fêmea de cada ninhada) nos testes da ontogenia comportamental anteriores ao desmame. Destes animais, eutanasiam-se 10 crias de cada sexo por nível de dose (um macho ou uma fêmea de cada ninhada) 22 dias após o nascimento. Remove-se o cérebro dos animais eutanasiados, após o que se pesa cada cérebro e se prepara o mesmo para a avaliação histopatológica. Registam-se ainda os dados ponderais dos cérebros não fixados dos restantes 10 machos e 10 fêmeas por nível de dose.

3. Utilizam-se outros 20 animais de cada sexo por nível de dose (um macho e uma fêmea de cada ninhada) nos testes funcionais/comportamentais posteriores ao desmame (exames clínicos aprofundados, atividade motora, sobressalto auditivo e ensaio da função cognitiva na adolescência) e na determinação da idade da maturidade sexual. Destes, no termo do estudo (aproximadamente 70 dias após o nascimento), anestesiam-se 10 dos animais de cada sexo expostos a cada nível de dose (um macho ou uma fêmea de cada ninhada) e fixam-se por perfusão. Após nova fixação *in situ*, remove-se o cérebro de cada um destes animais e prepara-se o mesmo para a avaliação neuropatológica.

4. Utilizam-se outras 20 crias de cada sexo por nível de dose (um macho e uma fêmea de cada ninhada) nos testes da função cognitiva em adultos jovens (por exemplo, 60 a 70 dias após o nascimento). Destes, no termo do estudo, eutanasiam-se 10 dos animais de cada sexo expostos a cada nível de dose (um macho ou uma fêmea de cada ninhada), removem-se os seus cérebros e pesam-se estes últimos.

5. Os restantes 20 animais de cada sexo por grupo ficam de reserva para outros testes eventualmente a realizar.

Quadro 1

N.º da cria (a)		N.º de crias integradas no ensaio	Exame/teste
m	F		
1	5	20 m + 20 f	Ontogenia comportamental
		10 m + 10 f	Peso cerebral/neuropatologia/ /morfometria 22 dias após o nascimento
		10 m + 10 f	Peso cerebral 22 dias após o nascimento
2	6	20 m + 20 f	Exames clínicos aprofundados
		20 m + 20 f	Atividade motora
		20 m + 20 f	Maturidade sexual
		20 m + 20 f	Funções motoras e sensoriais
		20 m + 20 f	Aprendizagem e memória (25 dias após o nascimento)
		10 m + 10 f	Peso cerebral/neuropatologia/ /morfometria em adultos jovens (aproximadamente 70 dias após o nascimento)

▼**M5**

N.º da cria (a)		N.º de crias integradas no ensaio	Exame/teste
m	F		
3	7	20 m + 20 f	Aprendizagem e memória (adultos jovens)
		10 m + 10 f	Peso cerebral em adultos jovens (aproximadamente 70 dias após o nascimento)
4	8	—	Animais de reserva para substituições ou outros testes

(a) Neste exemplo, as ninhadas são reduzidas a 4 machos e 4 fêmeas, por eliminação dos restantes animais; as crias do sexo masculino são numeradas de 1 a 4; as do sexo feminino, de 5 a 8.

Exemplo 2

6. Utilizam-se 20 crias de cada sexo por nível de dose (um macho e uma fêmea de cada ninhada) nos testes de ontogenia comportamental anteriores ao desmame. Destes animais, eutanasiam-se 10 crias de cada sexo por nível de dose (um macho ou uma fêmea de cada ninhada) 11 dias após o nascimento. Remove-se o cérebro dos animais eutanasiados, após o que se pesa cada cérebro e se prepara o mesmo para a avaliação histopatológica.

7. Utilizam-se outros 20 animais de cada sexo por nível de dose (um macho e uma fêmea de cada ninhada) nos exames posteriores ao desmame (exames clínicos aprofundados, atividade motora, determinação da idade da maturidade sexual e funções motoras e sensoriais). Destes, no termo do estudo (aproximadamente 70 dias após o nascimento), anestesiam-se 10 dos animais de cada sexo expostos a cada nível de dose (um macho ou uma fêmea de cada ninhada) e fixam-se por perfusão. Após nova fixação *in situ*, remove-se o cérebro de cada um destes animais e prepara-se o mesmo para a avaliação neuropatológica.

8. Utilizam-se 10 crias de cada sexo por nível de dose (um macho ou uma fêmea de cada ninhada) nos testes da função cognitiva na adolescência e em adultos jovens. Utilizam-se animais diferentes nos testes da função cognitiva efetuados 23 dias após o nascimento e a adultos jovens. No termo do estudo, eutanasiam-se 10 animais de cada sexo em cada grupo de animais adultos ensaiados, removem-se os seus cérebros e pesam-se estes últimos.

9. Os restantes 20 animais de cada sexo por grupo, não selecionados para os testes, são eutanasiados e eliminados quando do desmame.

Quadro 2

N.º da cria (a)		N.º de crias integradas no ensaio	Exame/teste
m	f		
1	5	20 m + 20 f	Ontogenia comportamental
		10 m + 10 f	Peso cerebral/neuropatologia/ /morfometria 11 dias após o nascimento
2	6	20 m + 20 f	Exames clínicos aprofundados
		20 m + 20 f	Atividade motora
		20 m + 20 f	Maturidade sexual
		20 m + 20 f	Funções motoras e sensoriais
		10 m + 10 f	Peso cerebral/neuropatologia/ /morfometria em adultos jovens (aproximadamente 70 dias após o nascimento)

▼**M5**

N.º da cria (a)		N.º de crias integradas no ensaio	Exame/teste
m	f		
3	7	10 m + 10 f (b)	Aprendizagem e memória (23 dias após o nascimento)
3	7	10 m + 10 f (b)	Aprendizagem e memória (adultos jovens) Peso cerebral em adultos jovens
4	8	—	Eutanásia e eliminação dos animais 21 dias após o nascimento

(a) Neste exemplo, as ninhadas são reduzidas a 4 machos e 4 fêmeas, por eliminação dos restantes animais; as crias do sexo masculino são numeradas de 1 a 4; as do sexo feminino, de 5 a 8.

(b) As crias utilizadas nos testes cognitivos efetuados 23 dias após o nascimento não são as mesmas utilizadas na realização desses testes em adultos jovens (por exemplo, ninhadas pares num caso e ímpares no outro, do total de 20).

Exemplo 3

10. Utilizam-se 20 crias de cada sexo por nível de dose (um macho e uma fêmea de cada ninhada) na determinação dos pesos cerebrais e na avaliação neuropatológica realizadas 11 dias após o nascimento. Destes animais, eutanasiam-se 10 crias de cada sexo por nível de dose (um macho ou uma fêmea de cada ninhada) 11 dias após o nascimento. Remove-se-lhes o cérebro, após o que se pesa cada cérebro e se prepara o mesmo para a avaliação histopatológica. Registam-se ainda os dados ponderais dos cérebros não fixados dos restantes 10 machos e 10 fêmeas por nível de dose.

11. Utilizam-se outros 20 animais de cada sexo por nível de dose (um macho e uma fêmea de cada ninhada) nos testes de ontogenia comportamental (atividade motora), nas avaliações após o desmame (atividade motora e determinação da idade de maturidade sexual) e no ensaio da função cognitiva na adolescência.

12. Utilizam-se outros 20 animais de cada sexo por nível de dose (um macho e uma fêmea de cada ninhada) nos testes das funções motoras e sensoriais (sobressalto auditivo) e para os exames clínicos aprofundados. Destes, no termo do estudo (aproximadamente 70 dias após o nascimento), anestesiam-se 10 dos animais de cada sexo expostos a cada nível de dose (um macho ou uma fêmea de cada ninhada) e fixam-se por perfusão. Após nova fixação *in situ*, remove-se o cérebro de cada um destes animais, pesa-se e prepara-se o mesmo para a avaliação neuropatológica.

13. Utilizam-se outras 20 crias de cada sexo por nível de dose (um macho e uma fêmea de cada ninhada) nos testes da função cognitiva em adultos jovens. Destes, no termo do estudo, eutanasiam-se 10 animais de cada sexo por grupo (um macho ou uma fêmea de cada ninhada), removem-se os seus cérebros e pesam-se estes últimos.

Quadro 3

N.º da cria (a)		N.º de crias integradas no ensaio	Exame/teste
m	f		
1	5	10 m + 10 f	Peso cerebral/neuropatologia/ /morfometria 11 dias após o nascimento
		10 m + 10 f	Peso cerebral 11 dias após o nascimento
2	6	20 m + 20 f	Ontogenia comportamental (atividade motora)
		20 m + 20 f	Atividade motora
		20 m + 20 f	Maturidade sexual
		20 m + 20 f	Aprendizagem e memória (27 dias após o nascimento)

▼**M5**

N.º da cria (a)		N.º de crias integradas no ensaio	Exame/teste
m	f		
3	7	20 m + 20 f	Sobressalto auditivo (adolescentes e adultos jovens)
		20 m + 20 f	Exames clínicos aprofundados
		10 m + 10 f	Peso cerebral/neuropatologia/ /morfometria em adultos jovens (aproximadamente 70 dias após o nascimento)
4	8	20 m + 20 f	Aprendizagem e memória (adultos jovens)
		10 m + 10 f	Peso cerebral em adultos jovens

(a) Neste exemplo, as ninhadas são reduzidas a 4 machos e 4 fêmeas, por eliminação dos restantes animais; as crias do sexo masculino são numeradas de 1 a 4; as do sexo feminino, de 5 a 8.

▼**M5**

Apêndice 2

Definições

Produto químico: substância ou mistura.

Produto químico em estudo: qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado este método de ensaio.

▼M5

B.54. BIOENSAIO UTEROTRÓFICO EM ROEDORES: ENSAIO DE DESPISTAGEM A CURTO PRAZO DE PROPRIEDADES ESTROGÉNICAS

INTRODUÇÃO

1. Este método é equivalente ao *Test Guideline* TG 440 (2007) da OCDE. Em 1998, a OCDE deu início a uma ação prioritária com vista à revisão das orientações existentes e à elaboração de novas orientações para despistagem e ensaio de potenciais desreguladores do sistema endócrino (1). Um dos elementos dessa ação foi a elaboração de um *Test Guideline* para o bioensaio uterotrófico em roedores. Este bioensaio foi, em seguida, objeto de um vasto programa de validação, que incluiu a compilação de um documento-base pormenorizado (2)(3) e a realização de amplos estudos intra e interlaboratoriais destinados a examinar a pertinência e a reprodutibilidade do bioensaio com um estrogéneo de referência muito ativo, agonistas fracos de recetores de estrogénios, um antagonista forte de recetores de estrogénios e um produto químico de referência negativo (4)(5)(6)(7)(8)(9). O presente método B.54 constitui o corolário da experiência adquirida durante o programa de validação do ensaio, bem como dos resultados nele obtidos relativamente aos agonistas de estrogénios.

2. O bioensaio uterotrófico constitui um ensaio de despistagem a curto prazo que remonta aos anos 30 (27)(28) e foi pela primeira vez normalizado para efeitos de despistagem, por uma comissão de peritos, em 1962 (32)(35). O ensaio baseia-se no aumento do peso uterino, designado por «resposta uterotrófica» (ver a referência 29). Avalia-se a capacidade de um determinado produto químico de induzir uma atividade biológica análoga à dos agonistas ou antagonistas dos estrogéneos naturais (por exemplo, o 17ß-estradiol), mas o ensaio é muito menos utilizado na deteção de antagonistas do que de agonistas. O útero responde aos estrogéneos de duas maneiras. A resposta inicial é um aumento do peso, devido à absorção de água. Segue-se um aumento de peso causado pelo crescimento dos tecidos (30). A reação do útero na fêmea de rato é comparável à que se verifica na ratinha.

3. Este bioensaio serve de ensaio de despistagem *in vivo*, enquadrando-se a sua aplicação no contexto do *Quadro conceptual da OCDE para ensaio e avaliação de produtos químicos desreguladores do sistema endócrino* (apêndice 2). Nesse quadro conceptual, o bioensaio uterotrófico inscreve-se no nível 3, enquanto ensaio *in vivo* que fornece dados acerca de um único mecanismo endócrino, a atividade estrogénica.

4. O bioensaio uterotrófico destina-se a ser incluído numa série de ensaios *in vitro* e *in vivo* que visam identificar produtos químicos suscetíveis de interagir com o sistema endócrino, tendo em vista a avaliação dos riscos para a saúde humana e para o ambiente. No programa de validação realizado pela OCDE, utilizaram-se agonistas fortes e fracos de estrogénios para avaliar a eficácia do ensaio na identificação de produtos químicos estrogénicos (4)(5)(6)(7)(8). Foi assim possível comprovar a sensibilidade do protocolo experimental aos agonistas de estrogénios, bem como a boa reprodutibilidade intra e interlaboratorial do mesmo.

5. No que respeita a produtos químicos «negativos», apenas foi incluído no programa de validação um produto químico de referência «negativo» já identificado como tal num ensaio uterotrófico e em ensaios *in vitro* de recetores e de ligação a recetores. No entanto, avaliaram-se outros dados experimentais, não relacionados com o programa de validação da OCDE, que corroboraram a especificidade do bioensaio uterotrófico para a despistagem de agonistas de estrogénios (16).

▼M5

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES

6. Os agonistas e antagonistas de estrogénios agem como ligandos dos recetores dos estrogénios a e b e podem ativar ou inibir, respetivamente, a atividade de transcrição dos recetores. Daí podem advir consequências negativas para a saúde, nomeadamente efeitos com incidências na reprodução e no desenvolvimento. É, pois, necessário poder determinar e avaliar rapidamente a capacidade agonista ou antagonista de estrogénios revelada pelos produtos químicos. Embora constituam informações úteis, a afinidade de um ligando por um recetor de estrogénios e a ativação da transcrição de genes relatores *in vitro* são apenas dois dos fatores determinantes de eventuais perigos. Outros fatores determinantes possíveis são a ativação ou desativação metabólicas após a entrada no organismo, a distribuição do produto químico pelos tecidos-alvo e a eliminação do produto químico do organismo, as quais, pelo menos em parte, dependem da via de administração e do produto químico em estudo. Daqui decorre a necessidade de despistar a eventual atividade dos produtos químicos *in vivo* em condições adequadas, a não ser que as características ADME (absorção, distribuição, metabolismo e eliminação) do produto químico já forneçam informações suficientes. Os tecidos uterinos reagem com um crescimento rápido e vigoroso à estimulação com estrogénios, designadamente em roedores de laboratório, cujo ciclo estral dura aproximadamente 4 dias. Os roedores, nomeadamente o rato, também são amplamente utilizados nos estudos de toxicidade para caracterização de perigos. O útero dos roedores é, portanto, um órgão-alvo adequado para a despistagem *in vivo* de agonistas e antagonistas de estrogénios.

7. O presente método baseia-se nos protocolos utilizados no estudo de validação realizado pela OCDE que se revelaram fiáveis e reprodutíveis nos estudos intra e interlaboratoriais efetuados (5)(7). Estão disponíveis dois métodos: um método no qual se utilizam fêmeas adultas ovariectomizadas e um método no qual se utilizam fêmeas imaturas não-ovariectomizadas. O programa de validação realizado pela OCDE mostrou que a sensibilidade e a reprodutibilidade dos dois métodos são comparáveis. Todavia, o método que utiliza fêmeas imaturas, cujo eixo hipotálamo-hipófise-gónadas está intacto, é um pouco menos específico, embora o seu campo de investigação seja mais amplo do que o do método que utiliza fêmeas ovariectomizadas, pois o método com fêmeas imaturas é sensível aos produtos químicos que interagem com o referido eixo e não unicamente aos produtos químicos que interagem com os recetores de estrogénios. No rato, o eixo hipotálamo-hipófise-gónadas está funcional aproximadamente aos 15 dias de idade. Antes desta idade, não é possível acelerar a puberdade com tratamentos como o da GnRH. Com a aproximação da puberdade, antes da abertura da vagina, as fêmeas têm vários ciclos silenciosos, sem abertura vaginal nem ovulação, mas que se manifestam por flutuações hormonais. Se um produto químico estimular direta ou indiretamente o eixo hipotálamo-hipófise-gónadas, a puberdade e a ovulação são antecipadas e dá-se uma aceleração da abertura da vagina. Os produtos químicos que agem sobre o referido eixo produzem este efeito, mas algumas dietas, com níveis de energia metabolizável mais elevados do que o normal, embora não sejam estrogénicas, estimulam o crescimento e aceleram a abertura vaginal. Esses produtos químicos não induzem respostas uterotróficas em animais adultos ovariectomizados, cujo eixo hipotálamo-hipófise-gónadas não funciona.

8. Numa perspetiva de bem-estar animal, deve privilegiar-se o método que utiliza animais imaturos, para evitar o pré-tratamento cirúrgico dos mesmos e a eventual impossibilidade de utilizar os animais que evidenciem sinais de entrada no ciclo estral (ver o ponto 30).

▼M5

9. A resposta uterotrófica não é inteiramente de origem estrogénica, pois determinados produtos químicos, que não são agonistas nem antagonistas de estrogénios, podem igualmente provocá-la. Por exemplo, doses relativamente elevadas de progesterona, testosterona ou diversas progestinas sintéticas também podem induzir uma estimulação (30). Pode efetuar-se uma análise histológica das respostas obtidas para pesquisar sinais de queratinização ou de cornificação da vagina (30). Independentemente da possível origem da resposta, um resultado positivo num bioensaio uterotrófico deve normalmente dar lugar a uma pesquisa mais aprofundada. O poder estrogénico pode ser confirmado por ensaios *in vitro*, como os ensaios de ligação aos recetores dose estrogénios e os ensaios de ativação da transcrição, ou por outros ensaios *in vivo*, como o ensaio de puberdade em fêmeas.

10. Atendendo a que o bioensaio uterotrófico constitui um ensaio de despistagem *in vivo*, o método de validação adotado favoreceu o bem-estar animal e optou por uma estratégia de ensaio por etapas. Para o efeito, o esforço concentrou-se na validação rigorosa da reprodutibilidade e da sensibilidade da despistagem da atividade estrogénica — o principal problema associado a muitos produtos químicos –, mas pouco trabalho foi consagrado à componente antiestrogénica do ensaio. Dado que o número de produtos químicos claramente antiestrogénicos (com atividade não dissimulada por atividade estrogénica) é muito reduzido, só foi ensaiado um produto químico antiestrogénico (com forte atividade). O presente método é, pois, dedicado ao protocolo estrogénico, enquanto o protocolo que descreve o modo antagonista do ensaio consta de um documento de orientações (37). A reprodutibilidade e a sensibilidade do ensaio para produtos químicos com atividade puramente antiestrogénica serão definidas com maior clareza ulteriormente, depois da aplicação regular do correspondente protocolo durante algum tempo e de se terem identificado mais produtos químicos com este modo de ação.

11. Pressupõe-se que todos os procedimentos com animais respeitarão as normas locais de manipulação de animais. As descrições, neste protocolo, dos cuidados a ter com os animais e do tratamento a dar aos animais são normas mínimas, prevalecendo, se for mais estrita, a regulamentação local, como a decorrente da Diretiva 2010/63/UE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 22 de setembro de 2010, relativa à proteção dos animais utilizados para fins científicos (38). Para mais orientações sobre o tratamento ético de animais, ver o documento da OCDE com a referência 25.

12. Tal como em qualquer ensaio com animais vivos, é essencial que, antes de se iniciar este ensaio, se tenha a certeza de que os dados pretendidos são realmente necessários. Seguem-se dois exemplos de situações nas quais podem sê-lo:

— potencial de exposição elevado (nível 1 do quadro conceptual descrito no apêndice 2) ou indícios de atividade estrogénica (nível 2) que justifiquem a necessidade de investigar o ocorrência de tais efeitos *in vivo*;

— efeitos reveladores de atividade estrogénica em ensaios *in vivo* dos níveis 4 ou 5, que justifiquem a necessidade de investigar se os efeitos em causa se relacionam com um mecanismo estrogénico não elucidável em ensaios *in vitro*.

13. No apêndice 1 definem-se alguns conceitos utilizados neste método.

▼M5

PRINCÍPIO DO MÉTODO

14. A sensibilidade do bioensaio uterotrófico assenta num dispositivo experimental constituído por animais cujo eixo hipotálamo-hipófise-ovários não funciona, daí resultando baixos níveis endógenos de estrogéneos em circulação. Esta situação proporciona pesos uterinos baixos à partida e maximiza a amplitude possível da resposta aos estrogénios administrados. Os roedores fêmeas preenchem estas condições nos seguintes estados de sensibilidade aos estrogénios:

i) Fêmeas imaturas após o desmame, mas antes da puberdade;

ii) Fêmeas adultas jovens ovariectomizadas, transcorrido um período adequado para a regressão dos tecidos uterinos.

15. Administra-se diariamente o produto químico em estudo por sonda esofágica ou injeção subcutânea. Administram-se doses crescentes constantes do produto químico em estudo a, pelo menos, dois grupos de animais (ver orientações no ponto 35), expondo cada grupo a um nível de dose. O período de administração é de três dias consecutivos, no caso do método com fêmeas imaturas, e de, pelo menos, três dias consecutivos, no caso do método com fêmeas adultas ovariectomizadas. Autopsiam-se os animais cerca de 24 horas após lhes ser administrada a última dose. Para o despiste de agonistas de estrogénios, compara-se o peso uterino médio dos grupos de animais expostos com o do grupo de animais aos quais foi administrado apenas o veículo, para determinar se ocorreu algum aumento com significado estatístico. Um aumento com significado estatístico do peso uterino médio de um grupo de animais expostos ao produto químico em estudo é revelador de uma resposta positiva neste bioensaio.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Escolha da espécie animal

16. Podem utilizar-se as estirpes habituais de roedores de laboratório, por exemplo as estirpes de ratos Sprague-Dawley e Wistar a que se recorreu na validação. Não devem utilizar-se estirpes cuja resposta uterina seja comprovadamente menor ou no caso de se suspeitar disso. O laboratório deve demonstrar a sensibilidade da estirpe utilizada conforme se explica nos pontos 26 e 27.

17. Desde os anos 30 que se têm utilizado fêmeas de rato e ratinhas nos bioensaios uterotróficos. Os estudos de validação realizados pela OCDE foram-no apenas em ratos, com base no pressuposto da equivalência entre essas espécies e, portanto, na boa probabilidade de que a utilização de apenas uma delas seria suficiente para a validação a nível mundial, permitindo economizar recursos e preservar animais. O rato é a espécie escolhida na maior parte dos estudos relativos à reprodução e ao desenvolvimento. Atendendo a que se dispõe de uma vasta base de dados históricos relativos ao ratinho e, portanto, para alargar o campo de aplicação do bioensaio uterotrófico nos roedores à utilização dessa espécie, efetuou-se um estudo de validação complementar limitado em ratinhas (16). Mantendo o propósito inicial de economizar recursos e preservar animais, adotou-se uma abordagem comparativa, no âmbito da qual se utilizou um número reduzido de produtos químicos, participou um pequeno número de laboratórios e as amostras não foram codificadas. Esse estudo de validação comparativo mostrou que existe uma boa correspondência, qualitativa e quantitativa, entre os dados obtidos nos bioensaios uterotróficos realizados em ratinhas adultas jovens ovariectomizadas e os dados obtidos em bioensaios análogos com fêmeas de rato. Quando os resultados do bioensaio uterotrófico se inserirem numa etapa preliminar de um estudo a longo prazo, torna-se possível utilizar animais da mesma estirpe e proveniência em ambos os estudos. A abordagem comparativa circunscreveu-se a ratinhas ovariectomizadas e o respetivo relatório não contém um conjunto de dados suficientemente sólido para validar o modelo que utiliza animais imaturos, razão pela qual a aplicação desse modelo a ratinhas não é abrangida pelo presente método.

▼M5

18. Conclui-se que, em alguns casos, podem ser utilizadas ratinhas em vez de fêmeas de rato. Nessa eventualidade, haverá que justificar a utilização dessa outra espécie, com base em critérios toxicológicos, farmacocinéticos e/ou outros. Poderá ser necessário alterar o protocolo se forem utilizadas ratinhas. Por exemplo, o consumo alimentar do ratinho, relativamente ao peso corporal, é superior ao do rato, pelo que o teor de fitoestrogénios dos alimentos dos ratinhos deve ser menor do que o teor de fitoestrogénios dos alimentos dos ratos (9)(20)(22).

Condições de alojamento e de alimentação

19. Todos os procedimentos devem respeitar as normas locais de manipulação de animais de laboratório. As descrições, neste protocolo, dos cuidados a ter com os animais e do tratamento a dar aos animais são normas mínimas, prevalecendo, se for mais estrita, a regulamentação local, como a decorrente da Diretiva 2010/63/UE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 22 de setembro de 2010, relativa à proteção dos animais utilizados para fins científicos (38). A temperatura do biotério deve ser de 22 °C (± 3 °C). A humidade relativa não deve ser inferior a 30 % e, de preferência, não deve exceder 70 %, exceto durante a limpeza do biotério. Idealmente, deve procurar manter-se a humidade relativa entre 50 % e 60 %. A iluminação deve ser artificial, com uma sequência de 12 horas de luz seguidas de 12 horas de escuridão.

20. Os animais devem receber *ad libitum* uma dieta de laboratório e água de beber. Os animais adultos jovens podem ser alojados individualmente ou em pequenos grupos de não mais de três por gaiola. Por serem juvenis, recomenda-se que os animais imaturos sejam alojados em gaiolas coletivas.

21. Sabe-se que teores elevados de fitoestrogénios nas dietas de laboratório aumentam o peso uterino em roedores num grau passível de interferir com os bioensaios uterotróficos (13)(14)(15). Teores elevados de fitoestrogénios nas dietas de laboratório e níveis elevados de energia metabolizável nas mesmas também podem induzir puberdade precoce, se forem utilizados animais imaturos. A presença de fitoestrogénios resulta, sobretudo, da incorporação de produtos de soja e de luzerna nas dietas de laboratório, tendo-se verificado que as concentrações de fitoestrogénios variam de lote para lote das dietas de laboratório (23). O peso corporal é uma variável importante, dado que a quantidade de alimentos ingerida está relacionada com este parâmetro. Por conseguinte, a dose de fitoestrogénio proveniente do consumo da mesma dieta pode variar de espécie para espécie e dependem da faixa etária (9). Proporcionalmente ao peso corporal, o consumo de alimentos de fêmeas de rato imaturas pode ser aproximadamente duplo do consumo de alimentos de fêmeas adultas jovens ovariectomizadas. Ainda proporcionalmente ao peso corporal, o consumo de alimentos de ratinhas adultas jovens pode ser aproximadamente quádruplo do consumo de alimentos de fêmeas adultas jovens de rato ovariectomizadas.

22. Os resultados dos bioensaios uterotróficos (9)(17)(18)(19) mostram, porém, que são aceitáveis pequenas quantidades de fitoestrogénios na dieta, as quais não reduzem a sensibilidade do ensaio. A título indicativo, no caso das fêmeas imaturas de rato das estirpes Sprague-Dawley e Wistar, o teor de fitoestrogénios da dieta de laboratório não deve exceder 350 µg de equivalente de genisteína por grama de dieta (6)(9). Uma dieta com tais características deve ser igualmente adequada para o estudo de fêmeas adultas jovens de rato ovariectomizadas, uma vez que, proporcionalmente ao peso corporal, o consumo de alimentos dos adultos jovens é inferior ao dos animais imaturos. Se forem utilizadas ratinhas adultas ovariectomizadas ou fêmeas de rato mais sensíveis aos fitoestrogénios, importará reduzir proporcionalmente os níveis de fitoestrogénios da dieta (20). Por outro lado, diferenças entre dietas ao nível da energia metabolizável disponível podem gerar desfasamentos no início da puberdade (21)(22).

▼M5

23. Antes de iniciar o estudo, é necessário escolher cuidadosamente uma dieta cujo nível de fitoestrogénios não seja elevado (ver orientações nas referências 6 e 9) e cujo nível de energia metabolizável não seja excessivo, dado que, caso contrário, os resultados podem ser falseados (15)(17)(19)(22)(36). A confirmação de que o dispositivo de ensaio utilizado pelo laboratório satisfaz os critérios de desempenho como se refere nos pontos 26 e 27 constitui uma verificação importante destes dois fatores. A título cautelar, em aplicação das boas práticas de laboratório, deve colher-se, para eventual análise do teor de fitoestrogénios, uma amostra representativa de cada lote de dieta fornecido durante o estudo — por exemplo, no caso de o peso uterino dos animais do grupo de controlo exceder os valores históricos de controlo ou se a resposta ao estrogénio de referência (17α-etinilestradiol) for inadequada. As partes alíquotas constituídas devem ser integradas no estudo e analisadas ou ser congeladas a –20 °C ou conservadas de um modo que permita evitar a decomposição da amostra antes da análise.

24. Algumas camas podem conter produtos químicos estrogénicos ou antiestrogénicos naturais (por exemplo, é sabido que as maçarocas de milho afetam os ciclos das fêmeas de rato e são antiestrogénicas). As camas utilizadas devem conter o mínimo de fitoestrogénios possível.

Preparação dos animais

25. Distribuem-se aleatoriamente animais de laboratório sem indícios de qualquer doença ou anomalia física pelos grupos de controlo e pelos grupos expostos. As gaiolas devem ser dispostas de forma a minimizar possíveis efeitos derivados do seu posicionamento. Os animais devem ser identificados individualmente. Durante o período de aclimatação, os animais imaturos devem permanecer em gaiolas acompanhados das respetivas mães ou de outras fêmeas aleitantes, até serem desmamados. O período de aclimatação antes do início do estudo deve ser de cerca de 5 dias, no caso dos animais adultos jovens e dos animais imaturos acompanhados das respetivas mães ou de outras fêmeas aleitantes. Se os animais imaturos a utilizar já tiverem sido desmamados e não estiverem acompanhados das respetivas mães ou de outras fêmeas aleitantes, pode ser necessário reduzir o período de aclimatação, dado que a administração das doses deve iniciar-se imediatamente após o desmame (ver o ponto 29).

PROCEDIMENTO DE ENSAIO

Verificação da competência técnica do laboratório

26. A competência dos laboratórios pode ser verificada de duas maneiras:

— Através de uma verificação periódica, por referência a um estudo de base inicial de controlo positivo (ver o ponto 27). Pelo menos de seis em seis meses e sempre que ocorram alterações suscetíveis de influenciar os resultados do ensaio (por exemplo, nova formulação da dieta, mudança do pessoal que faz as dissecações, mudança da estirpe ou do fornecedor dos animais, etc.), deve verificar-se a resposta do dispositivo de ensaio (o modelo animal) a uma dose adequada (baseada no estudo de base inicial de controlo positivo referido no ponto 27) de um estrogénio de referência: o 17a-etinilestradiol (n.º CAS 57-63-6).

— Através da utilização de grupos de controlo paralelos, incluindo em cada ensaio um grupo ao qual é administrada uma dose adequada do estrogénio de referência.

Se o dispositivo não responder como previsto, devem examinar-se as condições experimentais, adaptando-as em conformidade. Recomenda-se, em ambos os casos, que a dose do estrogénio de referência corresponda a DE_{70-80} (DE: dose eficaz).

▼M5

27. **Estudo de base inicial de controlo positivo** — Antes de um determinado laboratório efetuar um estudo no qual aplique o presente método pela primeira vez, é necessário demonstrar a competência técnica do laboratório determinando a resposta do modelo animal a um mínimo de quatro doses de um estrogénio de referência: 17a-etinilestradiol (n.º CAS 57-63-6). Compara-se o efeito no peso uterino com dados históricos atestados (ver a referência 5). Se os resultados deste estudo de base inicial não forem os previstos, devem examinar-se as condições experimentais, adaptando-as em conformidade.

Número e estado dos animais

28. O número mínimo de animais de cada grupo exposto ou de controlo é de seis, tanto no caso do protocolo com fêmeas imaturas como do protocolo com fêmeas adultas ovariectomizadas.

Idade dos animais imaturos

29. É necessário indicar o dia de nascimento dos animais utilizados na variante do bioensaio uterotrófico que recorre a animais imaturos. A administração das doses deve iniciar-se suficientemente cedo, para garantir que, no final da administração do produto químico em estudo, ainda não tenha ocorrido o aumento fisiológico dos estrogénios endógenos associado à puberdade. Por outro lado, há indícios de que os animais muito jovens podem ser menos sensíveis. Para definir a idade ótima, cada laboratório deve atender aos seus dados históricos sobre a maturidade sexual dos animais.

Como regra geral, a administração das doses às fêmeas de rato pode iniciar-se imediatamente após um desmame precoce, 18 dias após o nascimento (para este efeito, o dia do nascimento é o dia 0). A administração de doses a fêmeas de rato deve terminar, de preferência, 21 dias após o nascimento, mas sempre antes do 25.º dia após o nascimento. Com efeito, depois disso, o eixo hipotálamo-hipófise-ovários torna-se funcional e os níveis de estrogénios endógenos podem começar a subir, aumentado concomitantemente os pesos uterinos médios de base e aumentando também os desvios-padrão dos grupos (2)(3)(10)(11)(12).

Ovariectomia

30. A ovariectomia das ratinhas e das fêmeas de rato dos grupos expostos e de controlo deve ocorrer entre a sexta e a oitava semanas de idade. No caso das fêmeas de rato, o período mínimo entre a ovariectomia e o primeiro dia de administração das doses é de 14 dias, a fim de permitir que o útero readquira um peso mínimo de base estável. No caso das ratinhas, o período mínimo entre a ovariectomia e o primeiro dia de administração das doses é de 7 dias. Uma vez que bastam pequenas quantidades de tecido dos ovários para gerar níveis significativos de estrogénios em circulação (3), os animais devem ser testados antes de serem utilizados, mediante a observação de células epiteliais de esfregaços vaginais obtidos em, pelo menos, cinco dias consecutivos (por exemplo, no caso das fêmeas de rato, do décimo ao décimo quarto dia após a ovariectomia). Os animais que apresentarem algum indício de entrada no ciclo estral não devem ser utilizados. Posteriormente, quando da autópsia, deve verificar-se se está presente algum tecido dos ovários nos cotos cicatriciais da ovariectomia. Se assim for, os dados relativos ao animal em causa não devem ser utilizados nos cálculos (3).

31. A ovariectomia é efetuada com o animal apoiado no ventre, depois de convenientemente anestesiado. Efetua-se uma incisão na zona dorsal lateral da parede abdominal, com cerca de 1 cm de extensão, no ponto intermédio entre o limite costal inferior e a crista ilíaca, afastada lateralmente alguns milímetros da orla lateral do músculo lombar. Extraem-se os ovários da cavidade abdominal, depositam-se num campo assético e efetua-se o corte na junção entre o oviduto e o corpo uterino. Depois de confirmar que não se verifica nenhuma hemorragia importante, sutura-se a parede abdominal e fecha-se a abertura na pele com agrafos ou com uma sutura adequada. A figura 1 ilustra esquematicamente os pontos de laqueação. Deve efetuar-se uma analgesia pós-operatória adequada, recomendada por um veterinário com experiência em roedores.

▼M5

Peso corporal

32. No método da ovariectomização de fêmeas adultas, não existe uma correlação entre o peso corporal e o peso uterino, porque este é afetado por hormonas como os estrogénios, mas não pelos fatores de crescimento que regulam o tamanho do corpo. No modelo que utiliza fêmeas imaturas, em contrapartida, durante o período de maturação o peso corporal está relacionado com o peso uterino (34). Por conseguinte, no início do estudo por aplicação do modelo que recorre a fêmeas imaturas, as diferenças de peso entre os animais utilizados devem ser mínimas, não se desviando mais de 20 % do peso médio. Para isso, o criador deve normalizar o tamanho das ninhadas, a fim de garantir que a progenitura das diversas progenitoras é alimentada sensivelmente do mesmo modo. Integram-se os animais nos grupos expostos e de controlo procedendo a uma distribuição aleatória de pesos, de maneira que o peso corporal médio de cada grupo não difira estatisticamente do peso corporal médio de qualquer outro grupo. Deve evitar-se integrar animais da mesma ninhada no mesmo grupo exposto, tanto quanto possível sem aumentar o número de ninhadas utilizadas no estudo.

Dosagem

33. Normalmente, dois grupos de dosagem e um grupo de controlo são suficientes para determinar se um produto químico pode ter atividade estrogénica *in vivo*. Por razões de bem-estar animal, privilegia-se, portanto, este modelo. No caso de se pretender traçar uma curva da relação entre a dose administrada e a resposta obtida ou efetuar uma extrapolação para doses mais baixas, são necessários, pelo menos, três grupos de dosagem. No caso de se pretender obter informações que vão além de uma identificação de atividade estrogénica (como, por exemplo, uma estimativa do poder estrogénico), deve ponderar-se um regime de dosagem diferente. Salvo no que respeita à exposição ao produto químico em estudo, os animais do grupo de controlo devem ser tratados do mesmo modo que os animais dos grupos ensaiados. Se for utilizado um veículo para administrar o produto químico em estudo, os animais do grupo de controlo devem receber a mesma quantidade de veículo utilizada nos grupos expostos (ou a maior quantidade de veículo utilizada nos grupos ensaiados, se aquela variar de grupo para grupo).

34. O objetivo, no caso do bioensaio uterotrófico, é selecionar doses que garantam a sobrevivência dos animais e não lhes provoquem efeitos tóxicos nem sofrimento significativos após três dias consecutivos de administração do produto químico, até à dose máxima diária de 1 000 mg/kg. Na escolha das doses devem ter-se em conta os dados eventualmente disponíveis sobre a toxicidade e a (toxico)cinética do produto químico em estudo ou de matérias afins. Para se estabelecer o nível de dose mais elevado, deve atender-se, em primeiro lugar, à DL_{50} e/ou aos dados sobre toxicidade aguda de que se disponha, a fim de evitar a morte dos animais e de os poupar a grande sofrimento ou aflição (24)(25)(26). A dose mais elevada deve ser a dose máxima tolerada (DMT), podendo também ser aceite um estudo realizado a um nível de dosagem que tenha induzido uma resposta uterotrófica positiva. A título exploratório, aceitam-se geralmente intervalos largos (por exemplo, meia unidade logarítmica, correspondente a um fator de progressão das doses de 3,2, ou mesmo uma unidade logarítmica) entre as doses administradas. Se não se dispuser de dados adequados para o efeito, pode efetuar-se um estudo exploratório, para facilitar a determinação das doses a utilizar.

35. Em alternativa, se for possível estimar a atividade estrogénica de um agonista com base em dados *in vitro* (ou *in silico*), esses dados podem ser tidos em conta na escolha das doses. Por exemplo, obtém-se uma estimativa da quantidade do produto químico em estudo que gerará respostas uterotróficas equivalentes às do agonista de referência (etinilestradiol) determinando a correspondente atividade *in vitro* relativamente à do etinilestradiol. A dose mais elevada a ensaiar resultará da multiplicação dessa dose equivalente por um fator adequado (10 ou 100, por exemplo).

▼M5

Estudo exploratório

36. Se necessário, pode efetuar-se um estudo exploratório preliminar com poucos animais. Para o efeito, pode utilizar-se o documento de orientações n.º 19 da OCDE (25), que define os sinais clínicos da toxicidade ou do sofrimento provocados em animais. Se for possível fazê-lo nesse estudo exploratório após três dias de administração das doses, procede-se à excisão e pesagem dos úteros cerca de 24 horas após a administração da última dose. Estes dados podem ser depois utilizados para afinar o estudo principal (escolha de uma dose máxima e de uma dose inferior aceitáveis e recomendação do número de grupos de dosagem).

Administração das doses

37. Administra-se o produto químico em estudo por sonda esofágica ou por injeção subcutânea. Ao escolher a via de administração, é necessário atender aos aspetos do bem-estar animal e a aspetos toxicológicos como a relação com a via de exposição humana ao produto químico (por exemplo, sonda esofágica para exposição por ingestão e injeção subcutânea para exposição por inalação ou por adsorção cutânea), tendo ainda em conta as propriedades físico-químicas do produto químico em estudo e, em especial, as informações toxicológicas e os dados metabólicos e cinéticos disponíveis (por exemplo, a necessidade de evitar metabolismos de primeira passagem ou melhor eficiência de uma determinada via de administração).

38. Sempre que possível, deve começar por ponderar-se a possibilidade de se utilizarem soluções/suspensões aquosas. Porém, dado que os ligandos de estrogénios ou os precursores metabólicos dos mesmos são geralmente hidrófobos, normalmente utiliza-se uma solução ou suspensão oleosa (por exemplo, em óleo de milho, de amendoim ou de gergelim ou em azeite). No entanto, uma vez que estes óleos têm valores calóricos e teores de gorduras diferentes, o veículo pode influenciar a absorção total de energia metabolizável e, em consequência disso, pode alterar as medições dos parâmetros determinados, designadamente o peso uterino, em especial no protocolo que utiliza fêmeas imaturas (33). Antes da realização do estudo é, portanto, necessário ensaiar o veículo previsto relativamente a grupos de controlo sem veículo. Pode dissolver-se o produto químico em estudo numa quantidade mínima de etanol a 95 % ou de outro solvente adequado, diluindo-se depois até à concentração final no veículo a utilizar nos ensaios. É necessário conhecer as características de toxicidade do solvente e verificá-las num grupo de controlo apenas exposto ao solvente. Se o produto químico em estudo for considerado estável, pode favorecer-se a sua dissolução aquecendo ligeiramente e agitando vigorosamente. Deve determinar-se a estabilidade do produto químico em estudo no veículo utilizado. Se o produto químico em estudo se mantiver estável durante todo o estudo, podem preparar-se uma alíquota inicial do mesmo e, diariamente, as diluições às doses necessárias.

39. A cronologia da administração das doses depende do modelo experimental (ver o ponto 29 para o protocolo com fêmeas imaturas e o ponto 30 para o protocolo com fêmeas adultas ovariectomizadas). No caso das fêmeas de rato imaturas, administra-se o produto químico em estudo três dias consecutivos. No caso das fêmeas de rato ovariectomizadas, também se recomendam exposições de três dias, mas são aceitáveis exposições mais longas, que podem melhorar a deteção de produtos químicos fracamente ativos. No caso das ratinhas ovariectomizadas, três dias de exposição são normalmente suficientes, sem que haja vantagens significativas no prolongamento da mesma até sete dias quando se trate de agonistas fortes de estrogéneos. Todavia, no caso dos estrogéneos fracos, tal não ficou demonstrado no estudo de validação (16), pelo que a administração das doses a ratinhas adultas ovariectomizadas deve prolongar-se por sete dias consecutivos.As doses devem ser administradas à mesma hora do dia e ser adaptadas de modo a manter um nível de dose constante em relação ao peso corporal de cada animal (por exemplo miligramas diários do produto químico em estudo por quilograma de peso corporal. Deve ainda minimizar-se a variabilidade do volume administrado proporcionalmente ao peso corporal, ajustando a concentração das soluções utilizadas de modo que, proporcionalmente ao peso corporal, o volume administrado seja o mesmo para todos os níveis de dose e todas as vias de administração.

▼M5

40. A administração forçada aos animais através de sonda esofágica deve efetuar-se numa dose diária única, por meio de um tubo estomacal ou de uma cânula de intubação adequada. O volume máximo de líquido que pode ser administrado de cada vez depende do tamanho do animal. Devem respeitar-se as normas locais de manipulação de animais, mas o volume administrado não deve exceder 5 ml por quilograma de peso corporal, salvo no caso das soluções aquosas, em que se permitem 10 ml por quilograma de peso corporal.

41. Se o produto químico em estudo for administrado por injeção subcutânea, deve ser injetada nos animais uma dose diária única. As doses devem ser administradas na região escapular dorsal ou na região lombar, por meio de uma seringa do tipo utilizado no teste da tuberculina (calibre 23 ou 25), dotada de uma agulha esterilizada. É facultativo rapar a pelagem dos animais no local da injeção. Devem registar-se as perdas ou escorrimentos nesse local, bem como todas as administrações incompletas de doses. O volume injetado diariamente a um rato não deve exceder 5 ml por quilograma de peso corporal, divididos por dois locais de injeção, salvo no caso das soluções aquosas, em que se permitem 10 ml por quilograma de peso corporal.

Exames

Exames gerais e clínicos

42. Deve efetuar-se um exame clínico geral pelo menos uma vez por dia; se forem detetados sinais de toxicidade, o exame deve ser mais frequente. De preferência, os exames devem ser efetuados à mesma hora ou às mesmas horas do dia, tendo em atenção o período previsto de efeitos mais acentuados após a administração do produto químico. Devem examinar-se todos os animais de modo a detetar os casos de mortalidade e morbilidade e sinais clínicos gerais como mudanças de comportamento, alterações da pele, da pelagem, dos olhos ou das mucosas e a ocorrência de secreções ou excreções e de reações neurovegetativas (por exemplo lacrimação, horripilação, alterações da dimensão pupilar, respiração anormal, etc.).

Peso corporal e consumo de alimentos

43. Deve pesar-se diariamente cada animal com a aproximação de 0,1 g, começando imediatamente antes do início da exposição, isto é, quando da repartição dos animais pelos grupos. A quantidade de alimentos consumida em cada gaiola durante o período de exposição pode também ser determinada por gaiola, a título facultativo, pesando os distribuidores de alimentos. Os resultados de consumo de alimentos devem ser expressos em gramas diários por animal.

Dissecação e pesagem dos úteros

44. Os animais devem ser eutanasiados 24 h após a última exposição. Idealmente, a ordem das autópsias deve ser aleatória no universo dos grupos, evitando seguir uma ordem crescente ou decrescente das doses, método que poderia afetar subtilmente os resultados. Constitui objetivo deste bioensaio determinar o peso do útero fresco e do útero enxuto. O peso fresco inclui o útero e o fluido luminal; o peso enxuto determina-se depois de pesado e removido o fluido luminal do útero.

45. Antes da dissecação, examina-se a vagina da cada animal imaturo, para determinar em que estado de abertura se encontra. A dissecação começa pela abertura da parede abdominal, com início na sínfise púbica. Em seguida, separam-se os cornos uterinos e os ovários (se presentes) da parede abdominal dorsal. Separam-se também a bexiga urinária e os ureteres das faces laterais e ventral do útero e da vagina. Libertam-se as aderências fibrosas entre o reto e a vagina, até ser possível identificar a junção do orifício vaginal e da pele perineal. Separam-se o útero e a vagina do resto do corpo efetuando uma incisão na parede vaginal imediatamente acima da junção com a pele perineal, conforme se ilustra na figura 2. Retira-se o útero do corpo cortando cuidadosamente a ligação do mesentério uterino ao longo da

▼M5

face dorsal lateral de cada corno uterino. Uma vez extraído o útero do corpo, a manipulação destes tecidos deve ser suficientemente rápida para evitar que os mesmos sequem. A perda de peso por secagem adquire maior importância no caso de tecidos pequenos, como o útero (23). Se presentes, retiram-se os ovários, por corte ao nível do oviduto, procedendo de modo a evitar perdas de fluido luminal pelos cornos uterinos. Se o animal tiver sido ovariectomizado, deve verificar-se se os cotos cicatriciais contêm vestígios de tecido dos ovários. Devem eliminar-se os restos de gordura e de tecido conjuntivo. Separa-se a vagina do útero imediatamente abaixo do colo do útero, de modo que este fique solidário com o corpo uterino, como se ilustra na figura 2.

46. Deposita-se cada útero num recipiente tarado e com uma marcação individualizada (por exemplo uma placa de Petri ou uma cápsula de pesagem de plástico), continuando a tomar as precauções necessárias para impedir a secagem antes da pesagem (por exemplo, pode pôr-se em cada recipiente um papel de filtro ligeiramente embebido em soro fisiológico). Pesam-se o útero e o fluido luminal com a aproximação de 0,1 mg (peso húmido do útero).

47. Procede-se em seguida à eliminação do fluido luminal de cada útero. Furam-se ambos os cornos uterinos ou cortam-se os mesmos longitudinalmente. Coloca-se cada útero sobre papel de filtro (por exemplo, Whatman n.º 3) ligeiramente humedecido e comprime-se cuidadosamente com um segundo papel de filtro, também ligeiramente humedecido, para remover completamente o fluido luminal. Pesa-se o útero sem o fluido luminal com a aproximação de 0,1 mg (peso enxuto do útero).

48. Pode utilizar-se o peso do útero no termo do ensaio para verificar se a idade adequada das fêmeas de rato imaturas não foi excedida, embora os dados históricos da estirpe de ratos utilizada pelo laboratório sejam determinantes quanto a este aspeto (para a interpretação dos resultados, ver o ponto 56).

Estudos facultativos

49. Após pesagem, pode colocar-se cada útero em formol a 10 % tamponado a pH neutro, para posterior exame histopatológico após coloração com hematoxilina e eosina. Pode examinar-se também a vagina (ver o ponto 9). Podem efetuar-se ainda medições morfométricas do epitélio do endométrio, para comparações quantitativas.

DADOS E RELATÓRIOS

Dados

50. Dados do estudo a fornecer:

— número de animais no início do ensaio;

— número e identidade dos animais que morreram ou foram eutanasiados durante o ensaio e data e hora de cada morte ou eutanásia;

— número e identidade dos animais com sinais de toxicidade e descrição dos sinais de toxicidade observados, nomeadamente o momento do seu aparecimento e a duração e intensidade dos efeitos tóxicos detetados;

— número e identidade dos animais com lesões e descrição dos tipos de lesões.

▼**M5**

51. Registam-se os dados correspondentes a cada animal no que respeita a peso corporal, peso uterino húmido e peso uterino enxuto. Deve recorrer-se a análises estatísticas unilaterais para determinar se a administração do produto químico em estudo provocou um aumento com significado estatístico ($p < 0,05$) do peso do útero, provocado por um agonista. Devem efetuar-se análises estatísticas que permitam determinar se o peso húmido e o peso enxuto do útero sofreram alterações em consequência da exposição. Por exemplo, pode efetuar-se uma análise de covariância dos dados (ANCOVA), sendo o peso corporal na autópsia a covariável. Antes da análise dos dados, pode efetuar-se uma transformação logarítmica de estabilização da variância dos dados uterinos. O teste de Dunnett e Hsu pode servir para estabelecer comparações par a par entre cada grupo exposto e os grupos de controlo do veículo e para calcular os intervalos de confiança. Pode recorrer-se a traçados de resíduos estudantizados para detetar eventuais valores aberrantes e avaliar a homogeneidade das variâncias. Aplicaram-se estes métodos no programa de validação realizado pela OCDE, com recurso ao processo dos modelos lineares gerais (PROC GLM) do sistema de análise estatística (SAS Institute, Cary, NC, EUA), versão 8 (6)(7).

52. Informações a constar do relatório final:

Instalações nas quais se realizaram os ensaios:

— pessoal responsável e responsabilidades de cada um no estudo;

— dados do estudo de base inicial de controlo positivo e dados periódicos de controlo positivo (ver os pontos 26 e 27).

Produto químico em estudo:

— caracterização dos produtos químicos em estudo;

— natureza física e propriedades físico-químicas pertinentes;

— método e frequência de preparação de diluições;

— dados obtidos sobre a estabilidade;

— análises das soluções administradas.

Veículo:

— caracterização do veículo utilizado no estudo (natureza, fornecedor e lote);

— justificação da escolha do veículo (se não for água).

Animais estudados:

— espécie e estirpe utilizadas e justificação das opções tomadas;

— fornecedor e instalações específicas do fornecedor;

— idades na entrega e datas de nascimento;

— no caso dos animais imaturos, se são fornecidos com as mães ou outras fêmeas aleitantes e data do desmame;

— elementos relativos ao processo de aclimatação dos animais;

— número de animais por gaiola;

— método e elementos relativos à identificação de cada animal e de cada grupo.

Condições de realização dos ensaios:

— elementos relativos ao processo de aleatorização (método utilizado);

— fundamentação da escolha das doses;

▼M5

— elementos relativos à formulação, concentrações obtidas, estabilidade e homogeneidade do produto químico em estudo;

— elementos relativos à administração do produto químico em estudo e fundamentação da via de exposição escolhida;

— dieta (nome, tipo, fornecedor, composição e, se conhecidos, níveis de fitoestrogénios);

— água fornecida (por exemplo, água da torneira ou água filtrada) e modo de fornecimento (tubagem a partir de um reservatório grande, garrafas, etc.);

— camas (nome, tipo, fornecedor e composição);

— registos das condições de engaiolamento, do período de iluminação, da temperatura e humidade ambientes, da limpeza do biotério;

— descrição pormenorizada das autópsias e da pesagem dos úteros;

— descrição dos métodos estatísticos utilizados.

Resultados

Por animal:

— todos os pesos corporais diários (desde a integração num grupo até à autópsia do animal), com a aproximação de 0,1 g;

— idade do animal (em dias, considerando dia 0 o do nascimento) no início da administração do produto químico em estudo;

— data e hora da administração de cada dose;

— volume e dose calculados administrados e registos de eventuais perdas durante ou depois da administração das doses;

— estado diário do animal, incluindo os exames efetuados e os sintomas detetados;

— causa presumida de morte (se o animal for encontrado moribundo ou morto durante o estudo);

— data e hora da eutanásia e período decorrido desde a administração da última dose;

— peso uterino húmido (com a aproximação de 0,1 mg) e eventuais registos de perdas de fluido luminal durante a dissecação e a preparação para a pesagem;

— peso uterino enxuto (com a aproximação de 0,1 mg).

Por grupo de animais:

— pesos corporais médios diários (com a aproximação de 0,1 mg) e respetivos desvios-padrão (desde a integração nos grupos até às autópsias);

— pesos uterinos húmidos médios e pesos uterinos enxutos médios (com a aproximação de 0,1 mg) e respetivos desvios-padrão;

— se for determinado, consumo diário de alimentos (calculado em gramas de alimentos consumidos por animal);

▼M5

— resultados das análises estatísticas comparativas dos pesos uterinos húmido e enxuto dos grupos expostos com as determinações correspondentes nos grupos de controlo do veículo;

— resultados das análises estatísticas comparativas do peso corporal total e do ganho de peso corporal dos grupos expostos com as determinações correspondentes nos grupos de controlo do veículo.

53. Resumo das principais orientações deste método de ensaio

	Rato	Ratinho
Animais		
Estirpe	Estirpe habituais de roedores de laboratório	
Número de animais	Pelo menos seis animais por grupo de dosagem	
Número de grupos	Pelo menos dois grupos expostos (ver orientações no ponto 33) e um grupo de controlo negativo Ver orientações relativas aos grupos de controlo positivo nos pontos 26 e 27	
Condições de alojamento e de alimentação		
Temperatura do biotério	22 °C ± 3 °C	
Humidade relativa	50-60 %; não inferior a 30 % nem superior a 70 %	
Sequência de luz e de escuridão	12 horas de luz seguidas de 12 horas de escuridão	
Dieta e água de beber	Ad libitum	
Alojamento	Individual ou em grupos de não mais de três animais (recomenda-se que os animais imaturos sejam alojados em grupo)	
Dieta e camas	Baixo nível de fitoestrogénios recomendado na dieta e nas camas	
Protocolo		
Método	Método (preferido) que recorre a fêmeas imaturas não ovariectomizadas Método que recorre a fêmeas adultas ovariectomizadas	Método que recorre a fêmeas adultas ovariectomizadas
Idade da exposição dos animais imaturos	Não antes de 18 dias após o nascimento. Administração das doses a completar antes de transcorridos 25 dias após o nascimento.	Não se aplica à presente versão do método.
Idade da ovariectomia	Entre 6 e 8 semanas	
Idade da exposição dos animais ovariectomizados	Pelo menos 14 dias entre a ovariectomia e o primeiro dia de administração das doses	Pelo menos 7 dias entre a ovariectomia e o primeiro dia de administração das doses
Peso corporal	A variação deste parâmetro deve ser mínima, não devendo exceder 20 % do peso médio	

▼M5

	Rato	Ratinho
Administração das doses		
Via de administração	Sonda esofágica ou injeção subcutânea	
Frequência da administração	Uma dose diária	
Volume administrado por sonda esofágica ou por injeção	≤ 5 ml/kg de peso corporal (ou até 10 ml/kg de peso corporal no caso das soluções aquosas) (injetados em dois locais, no caso da via subcutânea)	
Duração da administração	3 dias consecutivos no caso do modelo que recorre a fêmeas imaturas Pelo menos 3 dias consecutivos no caso do modelo que recorre a fêmeas adultas ovariectomizadas	7 dias consecutivos no caso do modelo que recorre a fêmeas adultas ovariectomizadas
Autópsia	Cerca de 24 horas após a última dose	
Resultados		
Resposta positiva	Aumento estatisticamente significativo do peso uterino médio (húmido e/ou enxuto)	
Estrogénio de referência	17α-etinilestradiol	

ORIENTAÇÕES PARA INTERPRETAÇÃO E ACEITAÇÃO DOS RESULTADOS

54. Em geral, deve considerar-se que um estudo de atividade estrogénica deu resultado positivo se, pelo menos no grupo exposto à dose mais elevada, ocorrer um aumento do peso uterino estatisticamente significativo ($p < 0,05$), comparativamente ao grupo de controlo do solvente. Corrobora ainda um resultado positivo a demonstração de uma relação biologicamente plausível entre a dose e a intensidade da resposta, tendo em atenção que a conjugação dos efeitos estrogénicos e antiestrogénicos do produto químico em estudo pode afetar a forma da curva de resposta à dosagem.

55. A dose máxima tolerada não deve ser excedida, a fim de possibilitar uma interpretação com significado dos dados. Nessa perspetiva, devem avaliar-se cuidadosamente as reduções de peso corporal, os sinais clínicos e outros dados obtidos.

56. Um aspeto importante a ponderar para a aceitação dos dados de um bioensaio uterotrófico é a questão dos pesos uterinos dos animais do grupo de controlo do veículo. Se forem detetados pesos elevados no grupo de controlo, podem ficar comprometidas a sensibilidade do bioensaio e a capacidade de deteção de agonistas muito fracos de estrogénios. As referências bibliográficas e os dados obtidos na validação do bioensaio uterotrófico indicam a possibilidade de ocorrência espontânea de pesos médios elevados nos grupos de controlo, em especial quando se trata de animais imaturos (2)(3)(6)(9). Uma vez que o peso uterino das fêmeas de rato imaturas depende de muitas variáveis, como a estirpe e o peso corporal, não é possível estabelecer um limite superior preciso para esse parâmetro. A título indicativo, se o peso do útero enxuto das fêmeas de rato imaturas de controlo estiver compreendido entre 40 e 45 mg, os resultados devem ser considerados suspeitos; se esse peso exceder 45 mg, o ensaio poderá ter de ser repetido. Todavia, este aspeto tem de ser analisado caso a caso (3)(6)(8). No ensaio de fêmeas de rato adultas, uma ovariectomia incompleta deixará restos de tecidos dos ovários, que podem produzir estrogénios endógenos e atrasar a regressão do peso uterino.

▼M5

57. A obtenção de pesos uterinos enxutos no grupo de controlo do veículo inferiores a 0,09 % do peso corporal, para fêmeas de rato imaturas, e inferiores a 0,04 % do peso corporal, para fêmeas adultas jovens ovariectomizadas, parece gerar resultados aceitáveis (ver o quadro 31 da referência 2). Se os pesos uterinos dos animais do grupo de controlo excederem estes valores, devem examinar-se vários fatores, nomeadamente a idade dos animais, a qualidade da ovariectomia, a ocorrência de fitoestrogénios na dieta, etc., e deve encarar-se com precaução um resultado negativo no ensaio (nenhuma indicação de atividade estrogénica).

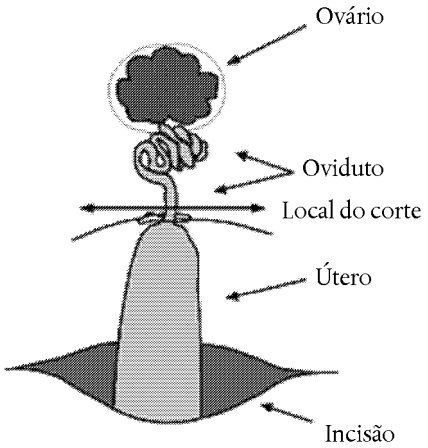
58. Os laboratórios devem conservar dados históricos dos grupos de controlo do veículo. Devem conservar igualmente dados históricos das respostas a estrogénios de referência positivos, como o 17a-etinilestradiol. Os laboratórios podem igualmente ensaiar a resposta a agonistas reconhecidamente fracos de estrogénios. Para garantir que os métodos do laboratório em causa têm sensibilidade suficiente, podem comparar-se todos estes dados com os dados disponíveis (2)(3)(4)(5)(6)(7)(8).

59. No estudo de validação realizado pela OCDE, os pesos uterinos enxutos evidenciaram menos variabilidade do que os pesos uterinos húmidos (6)(7). Todavia, considera-se que uma resposta significativa em qualquer destes parâmetros indica que o produto químico em estudo tem atividade estrogénica.

60. A resposta uterotrófica não é inteiramente de origem estrogénica. Porém, um resultado positivo num bioensaio uterotrófico deve, geralmente, ser interpretado como prova de atividade estrogénica *in vivo* e, normalmente, deve dar lugar a uma pesquisa mais aprofundada (ver o ponto 9 e o *Quadro conceptual da OCDE para ensaio e avaliação de produtos químicos desreguladores do sistema endócrino* — apêndice 2).

Figura 1

Desenho esquemático ilustrativo da ablação dos ovários



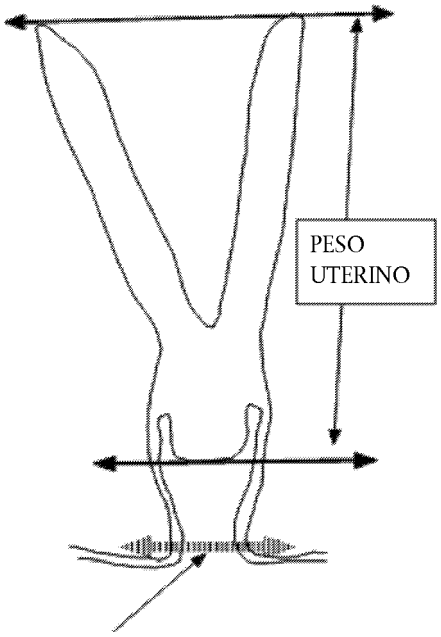
Não se mostram o mesométrio, o sistema vascular e as bolsas adiposas.

Começa-se por efetuar uma incisão na zona dorsal lateral da parede abdominal, no ponto intermédio entre o limite costal inferior e a crista ilíaca, afastada lateralmente alguns milímetros da orla lateral do músculo lombar. Localizam-se os ovários na cavidade abdominal. Retiram-se os ovários da cavidade abdominal para um campo assético, laqueia-se o canal entre cada ovário e o útero, para conter a hemorragia, e separam-se os ovários efetuando uma incisão acima do ponto de laqueação situado na junção de cada oviduto com o corno uterino. Depois de confirmar que não se verifica nenhuma hemorragia importante, sutura-se a parede abdominal e fecha-se a abertura na pele, por exemplo com agrafos ou por sutura. Os animais devem poder restabelecer-se e o peso do útero deve poder regredir durante, pelo menos, 14 dias, antes da utilização.

▼**M5**

Figura 2

Remoção e preparação dos tecidos uterinos para a pesagem



Começa-se por abrir a parede abdominal na sínfise púbica. Em seguida, separam-se ambos os ovários (se estiverem presentes) e os cornos uterinos da parede abdominal dorsal. Separam-se também a bexiga urinária e os ureteres das faces laterais e ventral do útero e da vagina. Libertam-se as aderências fibrosas entre o reto e a vagina, até ser possível identificar a junção do orifício vaginal e da pele perineal. Separam-se o útero e a vagina do resto do corpo efetuando uma incisão na parede vaginal imediatamente acima da junção com a pele perineal, conforme se ilustra na figura. Retira-se o útero do corpo cortando cuidadosamente a ligação do mesentério uterino ao longo da face dorsal lateral de cada corno uterino. Uma vez extraído o útero do corpo, eliminam-se os restos de gordura e de tecido conjuntivo. Se presentes, retiram-se os ovários por corte ao nível do oviduto, procedendo de modo a evitar perdas de fluido luminal pelos cornos uterinos. Se o animal tiver sido ovariectomizado, deve verificar-se se os cotos cicatriciais contêm vestígios de tecido dos ovários. Separa-se a vagina do útero imediatamente abaixo do colo do útero, de modo que este fique solidário com o corpo uterino, como se ilustra na figura. Pode então pesar-se o útero.

▼**M5**

Apêndice 1

DEFINIÇÕES

Atividade antiestrogénica: capacidade do produto químico de suprimir a ação do 17ß-estradiol num mamífero.

Produto químico: substância ou mistura.

Data de nascimento: dia 0 após o nascimento.

Dosagem: termo geral que abrange a dose, a frequência desta e a duração da administração da mesma.

Dose: quantidade de produto químico em estudo administrada. No bioensaio uterotrófico, exprime-se em peso diário do produto químico em estudo por unidade de peso corporal do animal ensaiado (por exemplo mg/kg de peso corporal/dia).

Dose máxima tolerável (DMT): quantidade máxima do produto químico que, quando introduzida no organismo, não mata os animais em estudo (indicada por DL_0) (IUPAC, 1993).

Atividade estrogénica: capacidade do produto químico de agir como o 17ß--estradiol num mamífero.

X dias após o nascimento: número X de dias de vida após o dia de nascimento.

Sensibilidade: proporção dos produtos químicos positivos/ativos que são corretamente classificados pelo ensaio. Constitui uma medida da exatidão dos métodos de ensaio que geram resultados categóricos e é um aspeto importante a ter em conta na avaliação da pertinência de um método de ensaio.

Especificidade: proporção dos produtos químicos negativos/inativos que são corretamente classificados pelo ensaio. Constitui uma medida da exatidão dos métodos de ensaio que geram resultados categóricos e é um aspeto importante a ter em conta na avaliação da pertinência de um método de ensaio.

Produto químico em estudo: qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado este método de ensaio.

Uterotrófico: termo usado para designar uma influência positiva no crescimento dos tecidos uterinos.

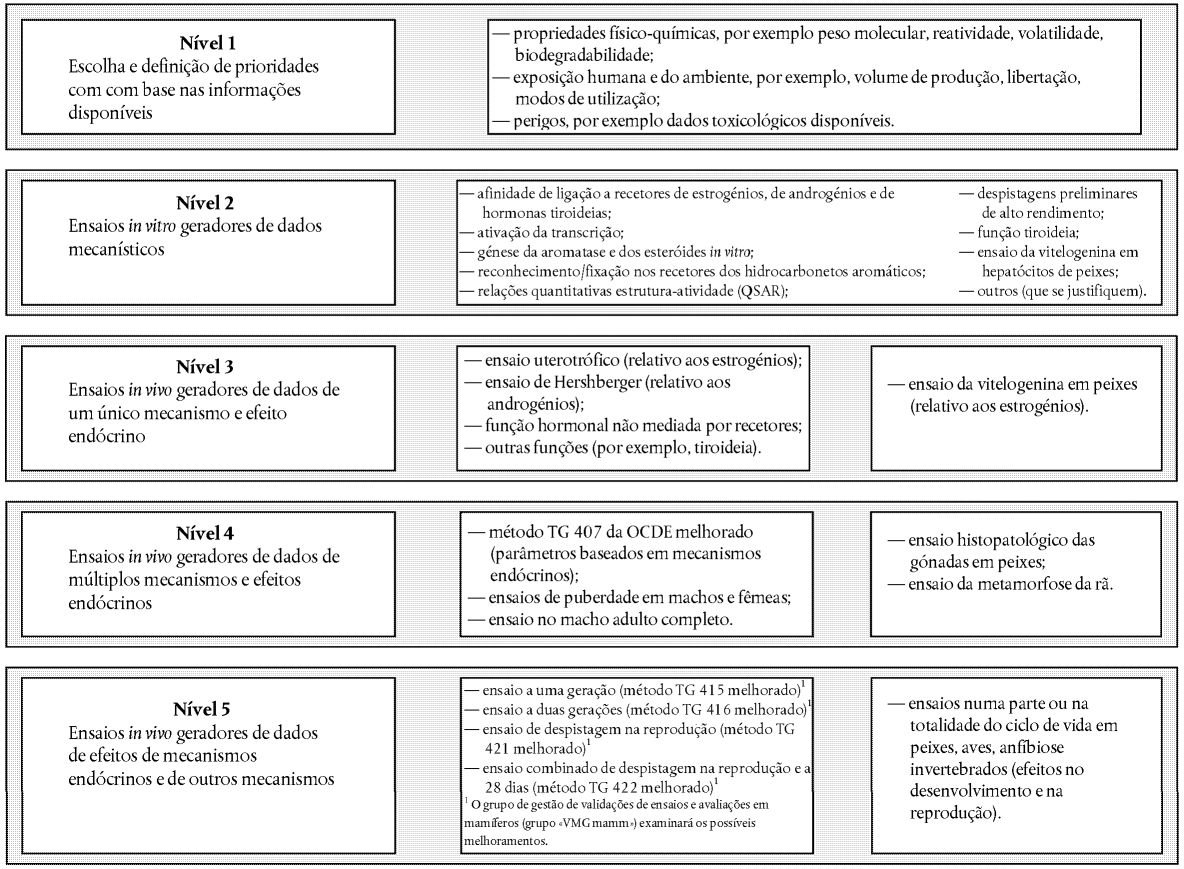
Validação: processo científico concebido para caracterizar as limitações e as condições operatórias dos métodos de ensaio e para demonstrar a fiabilidade e a pertinência dos mesmos para determinado fim.

▼M5

Apêndice 2

Nota: Documento elaborado pelo Secretariado do *Test Guidelines Programme*da OCDE com base no acordo alcançado na 6.ª reunião da *Task Force* para o ensaio e a avaliação de desreguladores do sistema endócrino (EDTA)

Quadro concetual da OCDE para ensaio e avaliação de produtos químicos desreguladores do sistema endócrino



02008R0440 — PT — 16.10.2019 — 008.001 — 911

▼**M5**

NOTAS EXPLICATIVAS DO QUADRO CONCEPTUAL

Nota 1: É possível entrar no quadro e dele sair em qualquer nível, consoante a natureza das informações necessárias para a avaliação dos perigos e dos riscos.

Nota 2: No nível 5, os métodos ecotoxicológicos devem integrar parâmetros indicativos dos mecanismos dos efeitos indesejados e dos mecanismos das consequências negativas potenciais nas populações.

Nota 3: Se um modelo multimodal abranger vários dos ensaios de parâmetro único, esse modelo substituirá estes últimos.

Nota 4: A avaliação de cada produto químico deve basear-se numa análise caso a caso que tenha em conta todas as informações disponíveis, tendo presente a função dos níveis do quadro.

Nota 5: Esta versão do quadro não deve ser considerada exaustiva. Nos níveis 3, 4 e 5, integra ensaios já disponíveis ou em validação. Estes últimos são incluídos a título provisório. Logo que estejam afinados e validados, serão formalmente integrados no quadro.

Nota 6: Os ensaios integrados no nível 5 não devem considerar-se unicamente de caráter definitivo. Os ensaios em questão contribuem para a avaliação geral dos perigos e dos riscos.

▼M5

REFERÊNCIAS

1. OCDE (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10 e 11 de março de 1998. ENV/MC/CHEM/RA(98)5.

2. OCDE (2003). Detailed Background Review of the Uterotrophic Bioassay: Summary of the Available Literature in Support of the Project of the OECD Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment (EDTA) to Standardise and Validate the Uterotrophic Bioassay. OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 38. ENV/JM/MONO(2003)1.

3. Owens J.W., Ashby J. (2002). Critical Review and Evaluation of the Uterotrophic Bioassay for the Identification of Possible Estrogen Agonists and Antagonists: In Support of the Validation of the OECD Uterotrophic Protocols for the Laboratory Rodent. *Crit. Rev. Toxicol.* 32:445-520.

4. OCDE (2006). OECD Report of the Initial Work Towards the Validation of the Rodent Uterotrophic Assay — Phase 1. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 65. ENV/JM/ /MONO(2006)33.

5. Kanno, J., Onyon L., Haseman J., Fenner-Crisp P., Ashby J., Owens W. (2001). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay to screen compounds for in vivo estrogenic responses: Phase 1. *Environ Health Perspect.* 109:785-94.

6. OCDE (2006). OECD Report of the Validation of the Rodent Uterotrophic Bioassay: Phase 2 — Testing of Potent and Weak Oestrogen Agonists by Multiple Laboratories. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 66. ENV/JM/MONO(2006)34.

7. Kanno J., Onyon L., Peddada S., Ashby J., Jacob E., Owens W. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two — Dose Response Studies. *Environ. Health Persp.* 111:1530-1549.

8. Kanno J., Onyon L., Peddada S., Ashby J., Jacob E., Owens W. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two — Coded Single Dose Studies. *Environ. Health Persp.* 111:1550-1558.

9. Owens W., Ashby J., Odum J., Onyon L. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two — Dietary phytoestrogen analyses. *Environ. Health Persp.* 111:1559-1567.

10. Ogasawara Y., Okamoto S., Kitamura Y., Matsumoto K. (1983). Proliferative pattern of uterine cells from birth to adulthood in intact, neonatally castrated, and/or adrenalectomized mice assayed by incorporation of [I^{125}]iododeoxyuridine. *Endocrinology* 113:582-587.

11. Branham W.S., Sheehan D.M., Zehr D.R., Ridlon E., Nelson C.J. (1985). The postnatal ontogeny of rat uterine glands and age-related effects of 17b--estradiol. *Endocrinology* 117:2229-2237.

12. Schlumpf M., Berger L., Cotton B., Conscience-Egli M., Durrer S., Fleischmann I., Haller V., Maerkel K., Lichtensteiger W. (2001). Estrogen active UV screens. *SÖFW-J.* 127:10-15.

13. Zarrow M.X., Lazo-Wasem E.A., Shoger R.L. (1953). Estrogenic activity in a commercial animal ration. *Science* 118:650-651.

14. Drane H.M., Patterson D.S.P., Roberts B.A., Saba N. (1975). The chance discovery of oestrogenic activity in laboratory rat cake. *Fd. Cosmet. Toxicol.* 13:425-427.

15. Boettger-Tong H., Murphy L., Chiappetta C., Kirkland J.L., Goodwin B., Adlercreutz H., Stancel G.M., Makela S. (1998). A case of a laboratory animal feed with high estrogenic activity and its impact on *in vivo* responses to exogenously administered estrogens. *Environ. Health Perspec.* 106:369--373.

▼M5

16. OCDE (2007). Additional data supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in rodents. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 67.

17. Degen G.H., Janning P., Diel P., Bolt H.M. (2002). Estrogenic isoflavones in rodent diets. *Toxicol. Lett.* 128:145-157.

18. Wade M.G., Lee A., McMahon A., Cooke G., Curran I. (2003). The influence of dietary isoflavone on the uterotrophic response in juvenile rats. *Food Chem. Toxicol.* 41:1517-1525.

19. Yamasaki K., Sawaki M., Noda S., Wada T., Hara T., Takatsuki M. (2002). Immature uterotrophic assay of estrogenic compounds in rats given different phytoestrogen content diets and the ovarian changes in the immature rat uterotrophic of estrogenic compounds with ICI 182,780 or antide. *Arch. Toxicol.* 76:613-620.

20. Thigpen J.E., Haseman J.K., Saunders H.E., Setchell K.D.R., Grant M.F., Forsythe D. (2003). Dietary phytoestrogens accelerate the time of vaginal opening in immature CD-1 mice. *Comp. Med.* 53:477-485.

21. Ashby J., Tinwell H., Odum J., Kimber I., Brooks A.N., Pate I., Boyle C.C. (2000). Diet and the aetiology of temporal advances in human and rodent sexual development. *J. Appl. Toxicol.* 20:343-347.

22. Thigpen J.E., Lockear J., Haseman J., Saunders H.E., Caviness G., Grant M.F., Forsythe D.B. (2002). Dietary factors affecting uterine weights of immature CD-1 mice used in uterotrophic bioassays. *Cancer Detect. Prev.* 26:381-393.

23. Thigpen J.E., Li L.-A., Richter C.B., Lebetkin E.H., Jameson C.W. (1987). The mouse bioassay for the detection of estrogenic activity in rodent diets: I. A standardized method for conducting the mouse bioassay. *Lab. Anim. Sci.* 37:596-601.

24. OCDE (2008). Acute oral toxicity — up-and-down procedure. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No 425. Paris.

25. OCDE (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 19. ENV/JM/MONO(2000)7.

26. OCDE (2001). Guidance document on acute oral toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 24. ENV/JM/MONO(2001)4.

27. Bulbring, E., Burn, J.H. (1935). The estimation of oestrin and of male hormone in oily solution. *J. Physiol.* 85:320-333.

28. Dorfman, R.I., Gallagher, T.F. Koch, F.C. (1936). The nature of the estrogenic substance in human male urine and bull testis. *Endocrinology* 19:33--41.

29. Reel, J.R., Lamb IV, J.C., Neal, B.H. (1996). Survey and assessment of mammalian estrogen biological assays for hazard characterization. *Fundam. Appl. Toxicol.* 34:288-305.

30. Jones, R.C., Edgren, R.A. (1973). The effects of various steroid on the vaginal histology in the rat. *Fertil. Steril.* 24:284-291.

31. OCDE (1982). Organization for Economic Co-operation and Development — Principles of Good Laboratory Practice. ISBN 92-64-12367-9. Paris.

32. Dorfman R.I. (1962). Methods in Hormone Research, volume II, parte IV: Standard Methods Adopted by Official Organization. Academic Press, Nova Iorque.

33. Thigpen J. E. *et al.*, (2004). Selecting the appropriate rodent diet for endocrine disruptor research and testing studies. *ILAR J.* 45(4):401-416.

▼**M5**

34. Gray L.E., Ostby J. (1998). Effects of pesticides and toxic substances on behavioral and morphological reproductive development: endocrine versus non-endocrine mechanism. *Toxicol. Ind. Health* 14(1-2):159-184.

35. Booth A.N., Bickoff E.M., Kohler G.O. (1960). Estrogen-like activity in vegetable oils and mill by-products. *Science* 131:1807-1808.

36. Kato H., Iwata T., Katsu Y., Watanabe H., Ohta Y., Iguchi T. (2004). Evaluation of estrogenic activity in diets for experimental animals using in vitro assay. *J. Agric. Food Chem.* 52, 1410-1414.

37. OCDE (2007). Guidance Document on the Uterotrophic Bioassay Procedure to Test for Antioestrogenicity. Series on Testing and Assessment, No. 71.

38. Diretiva 2010/63/UE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 22 de setembro de 2010, relativa à proteção dos animais utilizados para fins científicos (JO L 276 de 20.10.2010, p. 33).

▼M5

B.55. **BIOENSAIO DE HERSHBERGER NO RATO: ENSAIO DE DESPISTAGEM A CURTO PRAZO DE PROPRIEDADES (ANTI)ANDROGÉNICAS**

INTRODUÇÃO

1. Este método é equivalente ao *Test Guideline* TG 441 (2009) da OCDE. Em 1998, a OCDE deu início a uma ação prioritária com vista à revisão das orientações existentes e à elaboração de novas orientações para despistagem e ensaio de potenciais desreguladores do sistema endócrino (1). Um dos elementos dessa ação foi a elaboração de um *Test Guideline* para o bioensaio de Hershberger no rato. Após várias décadas de utilização pela indústria farmacêutica, este ensaio foi pela primeira vez normalizado em 1962, por uma comissão de peritos oficiais, como meio de despistagem de produtos químicos androgénicos (2). Entre 2001 e 2007, o bioensaio de Hershberger no rato foi objeto de um vasto programa de validação, que incluiu a elaboração de um documento-base de recensão (23), a compilação de um artigo pormenorizado sobre o método (3), a elaboração de um guia de dissecação (21) e a realização de amplos estudos intra e interlaboratoriais para verificar a fiabilidade e reprodutibilidade deste bioensaio. Os estudos de validação realizaram-se com um androgénio de referência muito ativo (o propionato de testosterona), dois androgénios sintéticos muito ativos (o acetato de trembolona e a metiltestosterona), um produto farmacêutico antiandrogénico muito ativo (a flutamida), um inibidor muito ativo da síntese da di-hidrotestosterona, o androgénio natural (a finasterida), vários pesticidas com fraca atividade antiandrogénica (linurão, vinclozolina, procimidona, p,p'-DDE), um inibidor muito ativo da 5α-redutase (a finasterida) e dois produtos químicos reconhecidamente inativos (dinitrofenol e nonilfenol) (4)(5)(6)(7)(8). O presente método de ensaio resulta da longa experiência histórica na aplicação do bioensaio de Hershberger, da experiência adquirida no programa de validação do mesmo e da apreciação dos resultados obtidos nesse programa.

2. O bioensaio de Hershberger constitui um ensaio de despistagem *in vivo* a curto prazo em tecidos acessórios do aparelho reprodutor masculino. O ensaio remonta aos anos 30 e foi modificado nos anos 40 pela inclusão dos músculos do referido aparelho que respondem aos androgénios (2)(9--15). Nos anos 60, avaliaram-se mais de 700 androgénios potenciais, recorrendo a uma versão normalizada do protocolo (2)(14). Ainda nos anos 60, o método foi considerado um ensaio normalizado para androgénios e antiandrogénios (2)(15). O bioensaio atual baseia-se nas variações ponderais de cinco tipos de tecido dependentes dos androgénios em ratos peripúberes castrados. Avalia-se a capacidade de um produto químico de induzir uma atividade biológica análoga às dos agonistas ou antagonistas de androgénios ou dos inibidores da 5α-redutase. Os cinco tipos de tecido dependentes dos androgénios utilizados neste método são a próstata ventral, as vesículas seminais (incluindo os fluidos e as glândulas coagulantes), o complexo formado pelos músculos elevatórios do ânus e bulbocavernosos, o par de glândulas de Cowper e a glande peniana. No rato peripúbere castrado, estes cinco tipos de tecido reagem aos androgénios aumentando de peso absoluto. Quando se estimulam os mesmos tecidos a aumentarem de peso por meio da administração de um androgénio de referência muito ativo, todos eles reagem aos antiandrogénios diminuindo de peso absoluto. O modelo primário do bioensaio de Hershberger, validado nas fases 1, 2 e 3 do programa de validação do método, é o macho peripúbere castrado cirurgicamente.

3. O bioensaio de Hershberger serve de ensaio de despistagem mecanístico *in vivo* de agonistas de androgénios, antagonistas de androgénios e inibidores da 5a-redutase, enquadrando-se a sua aplicação no contexto do *Quadro conceptual da OCDE para ensaio e avaliação de produtos químicos desreguladores do sistema endócrino* (apêndice 2). Nesse quadro conceptual, o bioensaio de Hershberger inscreve-se no nível 3, enquanto ensaio *in vivo* que fornece dados acerca de um único mecanismo endócrino, a (anti)androgenicidade. O bioensaio de Hershberger destina-se a ser incluído numa

▼M5

série de ensaios *in vitro* e *in vivo* que visam identificar produtos químicos suscetíveis de interagir com o sistema endócrino, tendo em vista a avaliação dos riscos para a saúde humana e para o ambiente.

4. Devido aos problemas de bem-estar animal colocados pela castração e a fim de evitar essa etapa, estudou-se como modelo alternativo para o ensaio de Hershberger o macho completo (não castrado) recentemente desmamado estimulado. O método com animais estimulados a seguir ao desmame foi validado (24). Porém, nos estudos de validação, a versão do ensaio de Hershberger que recorre a animais recentemente desmamados não se revelou adequada para detetar capazmente os efeitos ponderais das doses de antiandrogénios fracos ensaiadas em órgãos dependentes dos androgénios, não tendo, portanto, sido incluída no presente método. Todavia, considerando que a sua utilização pode ser vantajosa, não apenas no plano do bem-estar animal, mas também como fonte de informação sobre outros modos de ação, a referida versão do método de Hershberger consta do documento de orientações n.º 115 da OCDE (25).

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES

5. Os agonistas e os antagonistas de androgénios agem como ligandos do recetor de androgénios e podem ativar ou inibir, respetivamente, a transcrição de genes controlada pelo recetor. Por outro lado, alguns produtos químicos (inibidores da 5a-redutase) inibem a conversão da testosterona no androgénio natural mais ativo di-hidrotestosterona em alguns tecidos-alvo dos androgénios. Desses produtos químicos podem advir consequências negativas para a saúde, nomeadamente efeitos com incidências na reprodução e no desenvolvimento. É, pois, necessário, do ponto de vista da regulamentação, poder determinar e avaliar rapidamente a capacidade agonista ou antagonista de androgénios, ou inibidora da 5a-redutase, revelada pelos produtos químicos. Embora constituam informações úteis, a afinidade de um ligando por um recetor de androgénios, medida pela ligação ao recetor, e a ativação da transcrição de genes relatores *in vitro* não são os únicos fatores determinantes de eventuais perigos. Constituem outros fatores determinantes a ativação ou desativação metabólicas após a entrada no organismo, a distribuição do produto químico pelos tecidos-alvo e a eliminação do produto químico do organismo. Daqui decorre a necessidade de despistar a eventual atividade dos produtos químicos *in vivo* em condições experimentais e de exposição adequadas. As avaliações *in vivo* são menos críticas se forem conhecidas as características ADME (absorção, distribuição, metabolismo e eliminação) do produto químico. Os tecidos dependentes dos androgénios reagem com um crescimento rápido e vigoroso à estimulação com androgénios, designadamente em ratos peripúberes castrados. Os roedores, nomeadamente o rato, também são amplamente utilizados nos estudos de toxicidade para caracterização de perigos. A versão do ensaio em ratos peripúberes castrados e nos cinco tecidos-alvo indicados adequa-se, pois, à despistagem *in vivo* de agonistas e antagonistas de androgénios e de inibidores da 5a-redutase.

6. O presente método baseia-se nos protocolos utilizados no estudo de validação realizado pela OCDE que se revelaram fiáveis e reprodutíveis nos estudos intra e interlaboratoriais efetuados (4)(5)(6)(7)(8). O presente método contempla um protocolo para androgénios e um protocolo para antiandrogénios

7. Embora a dose de propionato de testosterona utilizada para detetar antiandrogénios no programa de validação do bioensaio de Hershberger realizado pela OCDE tenha sido diferente de laboratório para laboratório (0,2 e 0,4 mg diários por quilograma, por injeção subcutânea), a capacidade de deteção de atividade antiandrogénica fraca ou forte pouco diferiu nestas duas variantes do protocolo. Todavia, é evidente que a dose de propionato de testosterona não deve ser tão elevada que bloqueie os efeitos dos antagonistas fracos de recetores de androgénios nem tão baixa que os tecidos androgénicos pouco cresçam, mesmo sem coadministração de um antiandrogénio.

▼M5

8. A reação de crescimento de cada tecido dependente dos androgénios não é inteiramente de origem androgénica, pois há outros produtos químicos, além dos agonistas de androgénios, que podem alterar o peso de determinados tecidos. Porém, uma reação concomitante de crescimento de vários tecidos corrobora a hipótese de um mecanismo mais específico dos androgénios. Por exemplo, doses elevadas de estrogénios muito ativos podem aumentar o peso das vesículas seminais, mas os outros tecidos dependentes dos androgénios, utilizados no ensaio, não reagirão da mesma maneira. Os produtos químicos antiandrogénicos podem agir como antagonistas dos recetores de androgénios ou como inibidores da 5a-redutase. Os efeitos dos inibidores da 5a-redutase são variáveis, porque a conversão na di-hidrotestosterona, mais ativa, depende do tecido. Os antiandrogénios que inibem a 5α — redutase, como a finasterida, têm efeitos mais pronunciados na próstata ventral do que noutros tecidos, comparativamente a antagonistas muito ativos de recetores de androgénios, como a flutamida. Esta diferença na resposta dos tecidos pode ser utilizada para distinguir modos de ação mediados por recetores de androgénios de modos de ação mediados pela 5α — redutase. Além disso, os recetores de androgénios estão relacionados, em termos evolutivos, com os recetores de outras hormonas esteroides e outras hormonas há que, quando administradas em doses suprafisiológicas elevadas, podem ligar-se a eles e desempenhar um papel antagonista dos efeitos do propionato de testosterona como ativador do crescimento (13). É ainda plausível que o reforço do metabolismo dos esteroides e a consequente diminuição da testosterona sérica reduzam o crescimento dos tecidos dependente dos androgénios. Por conseguinte, um resultado positivo no bioensaio de Hershberger deve, normalmente, ser avaliado com base na ponderação da suficiência de prova também em ensaios *in vitro*, como ensaios de ligação aos recetores de androgénios e aos recetores de estrogénios e os correspondentes ensaios de ativação da transcrição, ou noutros ensaios *in vivo*, nos quais se examinem tecidos-alvo similares dos androgénios, como o ensaio no macho púbere, o ensaio de 15 dias no macho adulto completo ou estudos com repetição da dose a 28 dias ou a 90 dias.

9. A experiência adquirida revela que os androgénios xenobióticos são mais raros do que os antiandrogénios xenobióticos. Consequentemente, é de prever que o bioensaio de Hershberger seja utilizado com maior frequência na despistagem de antiandrogénios. Todavia, pode recomendar-se a aplicação do protocolo de ensaio relativo aos androgénios a esteroides e a produtos químicos análogos dos esteroides, bem como a produtos químicos para os quais a aplicação de métodos dos níveis 1 ou 2 do quadro conceptual (apêndice 2) tenha dado indicações de possíveis efeitos androgénicos. Analogamente, os ensaios do nível 5 podem permitir observar efeitos indesejáveis associados a perfis (anti)androgénicos, que aconselhem uma avaliação destinada a verificar se o produto químico em causa age por via endócrina.

10. Pressupõe-se que todos os procedimentos com animais respeitarão as normas locais de manipulação de animais. As descrições, nestes protocolos, dos cuidados a ter com os animais e do tratamento a dar aos animais são normas mínimas, prevalecendo, se for mais estrita, a regulamentação local, como a decorrente da Diretiva 2010/63/UE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 22 de setembro de 2010, relativa à proteção dos animais utilizados para fins científicos (26). Para mais orientações sobre o tratamento ético de animais, ver o documento da OCDE com a referência 17.

11. Tal como em qualquer bioensaio no qual se utilizem animais, deve ponderar-se cuidadosamente a necessidade de efetuar o presente estudo. São fundamentalmente duas as razões em que pode fundamentar-se a decisão de realizar o estudo:

— potencial de exposição elevado (nível 1 do quadro conceptual) ou indícios de atividade (anti)androgénica em ensaios *in vitro* (nível 2) que justifiquem a necessidade de investigar a ocorrência de tais efeitos *in vivo*;

— efeitos de natureza (anti)androgénica em ensaios *in vivo* dos níveis 4 ou 5, que justifiquem a necessidade de investigar o modo de ação, por exemplo a fim de determinar se os efeitos em causa se devem a um mecanismo (anti)androgénico.

▼M5

12. No apêndice 1 definem-se alguns conceitos utilizados neste método.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

13. A sensibilidade do bioensaio de Hershberger radica na utilização de machos cuja produção de androgénios endógenos é mínima. Utilizam-se, para isso, machos castrados, prevendo um período adequado após a castração para que os tecidos visados readquiram um peso de base mínimo uniforme. Nestas circunstâncias, ao efetuar a despistagem da eventual atividade androgénica, os níveis de androgénios endógenos em circulação são baixos, o eixo hipotálamo-hipófise-gónadas é incapaz de os repor por mecanismos de retroação, a capacidade de resposta dos tecidos é máxima e a variabilidade do peso inicial dos tecidos é mínima. Ao efetuar a despistagem da eventual atividade antiandrogénica, consegue-se que o ganho de peso dos tecidos seja maior se estes forem estimulados com um androgénio de referência. Em consequência disto, no bioensaio de Hershberger só são necessários seis animais por grupo de dosagem, ao passo que noutros ensaios, que recorram a machos púberes ou adultos completos, se recomendam 15 machos por grupo de dosagem.

14. A castração dos ratos peripúberes deve realizar-se de um modo adequado, mediante a aplicação de técnicas de anestesia e de assepsia aprovadas. Para eliminar o desconforto pós-operatório, devem administrar-se analgésicos nos primeiros dias após a cirurgia. Ao eliminar os mecanismos de retroação endócrinos compensatórios presentes no animal completo, que podem atenuar os efeitos dos androgénios e antiandrogénios administrados, e concomitantemente também a grande variabilidade dos níveis séricos de testosterona que se verificam de indivíduo para indivíduo, a castração melhora a precisão do ensaio na deteção de androgénios e antiandrogénios fracos. A castração reduz, portanto, o número dos animais necessários à despistagem das atividades endócrinas em apreço.

15. Na despistagem de uma possível atividade androgénica, administra-se o produto químico em estudo diariamente, por sonda esofágica ou injeção subcutânea, durante dez dias consecutivos, a, pelo menos, dois grupos de animais, sendo cada grupo exposto a um nível de dose diferente. Eutanasiam-se os animais cerca de 24 horas após lhes ser administrada a última dose. Um aumento com significado estatístico do peso de dois ou mais órgãos-alvo no caso dos grupos expostos ao produto químico em estudo, comparativamente ao grupo de controlo do veículo, constitui uma indicação de atividade androgénica potencial do produto químico em causa (ver o ponto 60). Androgénios como a trembolona, que não sofrem os efeitos da 5α — redutase, afetam mais o complexo formado pelos músculos elevatórios do ânus e bulbocavernosos e a glande peniana do que o propionato de testosterona, mas todos os tecidos devem aumentar de peso.

16. No rastreio de uma possível atividade antiandrogénica, administra-se o produto químico em estudo diariamente, por sonda esofágica ou injeção subcutânea, durante dez dias consecutivos, juntamente com doses diárias de propionato de testosterona (0,2 ou 0,4 mg diários por quilograma), por injeção subcutânea. Determinou-se no programa de validação que podem utilizar-se 0,2 ou 0,4 mg diários de propionato de testosterona por quilograma, dado que ambas as quantidades permitem detetar os antiandrogénios, devendo escolher-se uma destas doses para o ensaio. Administram-se doses crescentes constantes do produto químico em estudo a, pelo menos, três grupos de animais, sendo cada grupo exposto a um nível de dose diferente. Eutanasiam-se os animais cerca de 24 horas após lhes ser administrada a última dose. Um decréscimo com significado estatístico do peso de dois ou mais órgãos-alvo no caso dos grupos expostos ao produto químico em estudo e ao propionato de testosterona, comparativamente ao grupo de controlo ao qual apenas é administrado propionato de testosterona, constitui uma indicação de atividade antiandrogénica potencial do produto químico em causa (ver o ponto 61).

▼M5

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Escolha da espécie e da estirpe

17. Desde os anos 30 que se tem utilizado o rato nos bioensaios de Hershberger. Embora, em termos biológicos, seja plausível que as respostas do rato e do ratinho sejam semelhantes, optou-se pelo rato para os ensaios de Hershberger para tirar partido de 70 anos de experiência com o modelo do rato. Além disso, dado que os resultados do bioensaio de Hershberger podem constituir os preliminares de um estudo plurigeracional a longo prazo, torna-se possível utilizar animais da mesma espécie, estirpe e proveniência em ambos os estudos.

18. Este protocolo permite que os laboratórios escolham a estirpe de rato que utilizam no ensaio, em geral a que cada laboratório utiliza normalmente. Podem utilizar-se as estirpes habituais de ratos de laboratório, mas não devem utilizar-se estirpes que atinjam a maturidade substancialmente mais tarde do que aos 42 dias de idade, dado que a castração de animais com 42 dias poderia inviabilizar a pesagem da glande peniana, que só pode ser efetuada depois da descolagem do prepúcio do resto de pénis. Por conseguinte, salvo raras exceções, não devem utilizar-se estirpes derivadas do rato Fisher 344, cujo desenvolvimento sexual tem uma cronologia diferente da de outras estirpes mais frequentemente utilizadas, como a Sprague-Dawley ou a Wistar (16). Se for utilizada uma estirpe derivada do rato Fisher 344, o laboratório deve castrar os ratos com uma idade ligeiramente maior e terá de demonstrar a sensibilidade da estirpe por que tiver optado. Compete a cada laboratório justificar com clareza a escolha da estirpe de rato. Se o ensaio de despistagem constituir uma etapa preliminar de um estudo por via oral com repetição da dose, de um estudo dos efeitos na reprodução ou no desenvolvimento ou de um estudo a longo prazo, devem utilizar-se animais da mesma estirpe e proveniência em todos os casos.

Condições de alojamento e de alimentação

19. Todos os procedimentos devem respeitar as normas locais de manipulação de animais de laboratório. As descrições, nestes protocolos, dos cuidados a ter com os animais e do tratamento a dar aos animais são normas mínimas, prevalecendo, se for mais estrita, a regulamentação local, como a decorrente da Diretiva 2010/63/UE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 22 de setembro de 2010, relativa à proteção dos animais utilizados para fins científicos (26). A temperatura do biotério deve ser de 22 °C (± 3 °C). A humidade relativa não deve ser inferior a 30 % e, de preferência, não deve exceder 70 %, exceto durante a limpeza do biotério. Idealmente, deve procurar manter-se a humidade relativa entre 50 % e 60 %. A iluminação deve ser artificial, com uma sequência de 12 horas de luz seguidas de 12 horas de escuridão.

20. Por serem juvenis e porque os ratos são animais sociais, recomenda-se o alojamento em gaiolas coletivas e não individualmente. O alojamento de dois ou três animais por gaiola evita a concentração e as tensões que lhe estão associadas, as quais podem interferir no controlo hormonal do desenvolvimento dos tecidos acessórios do aparelho sexual. As gaiolas devem ser cuidadosamente limpas para remover eventuais contaminantes e ser dispostas de forma a minimizar possíveis efeitos derivados do seu posicionamento. Devem ter tamanho suficiente para os animais que nelas se alojam (superfície de aproximadamente 2 000 cm^2).

21. Deve identificar-se individualmente cada animal recorrendo a um método não-agressivo (por exemplo por marcação ou etiqueta auricular). O método de identificação deve ser mencionado no relatório.

▼M5

22. Os animais devem receber *ad libitum* uma dieta de laboratório e água de beber. O laboratório deve utilizar no bioensaio de Hershberger a dieta de laboratório a que normalmente recorre no seu trabalho experimental com produtos químicos. Nos estudos de validação deste bioensaio, não se detetaram efeitos nem variabilidades atribuíveis à dieta. A dieta utilizada deve ser referida no relatório. Deve conservar-se uma amostra dessa dieta para a realização das análises que possam vir a ser necessárias.

Requisitos aplicáveis ao peso dos órgãos dependentes dos androgénios

23. No estudo de validação, não houve indícios de que uma diminuição do peso corporal tivesse incidências no aumento ou na diminuição do ganho de peso dos tecidos-alvo (os tecidos que está previsto pesar neste estudo).

24. O peso dos órgãos dependentes dos androgénios das várias estirpes de rato utilizadas com êxito no programa de validação revelou-se maior nas estirpes mais corpulentas do que nas estirpes mais leves. Por conseguinte, não se incluem nos requisitos do bioensaio de Hershberger pesos absolutos previsíveis dos órgãos dos animais de controlo positivo e negativo.

25. Uma vez que o coeficiente de variação de um tecido é inversamente proporcional ao poder estatístico, os requisitos do bioensaio de Hershberger baseiam-se em coeficientes de variação máximos admissíveis para cada tecido (quadro 1). Os coeficientes de variação indicados no quadro resultaram dos estudos de validação realizados pela OCDE. No caso de resultados negativos, o laboratório deve examinar os coeficientes de variação do grupo de controlo e do grupo exposto à dose mais elevada, a fim de determinar se os requisitos de coeficiente de variação máximo foram excedidos.

26. Deve repetir-se o estudo nos seguintes casos: 1) três ou mais dos dez coeficientes de variação possíveis no grupo de controlo e no grupo exposto à dose mais elevada excedem os máximos indicados nos quadros 1 para os estudos de agonistas e de antagonistas e 2) pelo menos dois tecidos-alvo são marginalmente não-significativos, isto é, apresentam valores de r compreendidos entre 0,05 e 0,10.

Quadro 1

Coeficientes de variação máximos admissíveis, determinados nos estudos de validação realizados pela OCDE, para os tecidos-alvo acessórios do aparelho sexual, aplicáveis ao modelo com ratos castrados ([1])

Tecido	Efeitos antiandrogénicos	Efeitos androgénicos
Vesículas seminais	40 %	40 %
Próstata ventral	40 %	45 %
Complexo formado pelos músculos elevatórios do ânus e bulbocavernosos	20 %	30 %
Glândulas de Cowper	35 %	55 %
Glande peniana	17 %	22 %

([1]) Determinou-se o limite máximo de coeficiente de variação correspondente a cada tecido a partir de um gráfico dos valores dos coeficientes de variação — organizados sequencialmente do menor ao maior — correspondentes a todas as médias de todas as experiências realizadas a um determinado modelo (agonista ou antagonista) durante os estudos de validação. Considerou-se que o coeficiente de variação máximo correspondia ao ponto — dito «de viragem» — a partir do qual os incrementos entre os coeficientes de variação mais elevados imediatos da série passavam a ser claramente maiores do que os existentes entre os coeficientes de variação imediatamente anteriores na série. Importa referir que, embora esta análise tenha permitido identificar pontos de viragem relativamente fiáveis para o modelo «antagonista» do ensaio, as curvas dos coeficientes de variação dos ensaios de agonistas revelaram incrementos mais uniformes, pelo que os coeficientes de variação máximos identificados por este método são algo arbitrários neste último caso.

▼M5

PROCEDIMENTO DE ENSAIO

Respeito da regulamentação e verificações no laboratório

27. Ao contrário do que se passa com o ensaio uterotrófico (capítulo B.54 deste anexo), no caso do bioensaio de Hershberger é desnecessário demonstrar a competência do laboratório antes do início do estudo, porque este ensaio compreende, em paralelo, o ensaio de um controlo positivo (propionato de testosterona e flutamida) e de um controlo negativo.

Número e estado dos animais

28. O número mínimo de animais de cada grupo exposto ou de controlo é de seis, tanto no caso do protocolo para androgénios como do protocolo para antiandrogénios.

Castração

29. Após a receção dos animais, deve existir um período inicial de aclimatação de vários dias, para verificar se os mesmos se encontram em boas condições de saúde e de vitalidade. Dado que, nos animais castrados com menos de 42 dias de idade (ou antes de transcorridos 42 dias após o nascimento), o descolamento do prepúcio pode não ter ocorrido, a castração deve realizar-se 42 dias após o nascimento ou em data posterior. Os animais são castrados sob anestesia. Efetua-se uma incisão no escroto, removem-se os testículos e os epidídimos e laqueiam-se os vasos sanguíneos e os canais seminíferos. Depois de confirmar que não há sangramento, fecha-se o escroto por sutura ou com agrafos. Para eliminar o desconforto pós-operatório, devem administrar-se analgésicos aos animais nos primeiros dias após a cirurgia. Se os animais forem adquiridos a um fornecedor já castrados, este deve garantir a idade e o estádio de maturidade sexual dos mesmos.

Aclimatação após castração

30. Para possibilitar a regressão do peso dos tecidos-alvo, os animais devem prosseguir a aclimatação às condições do laboratório durante um período mínimo de sete dias após a castração. Devem ser examinados diariamente e os que apresentem sinais de doenças ou de anomalias físicas devem ser retirados. A exposição às doses em estudo pode, portanto, iniciar-se 49 dias após o nascimento, mas não depois dos 60 dias de idade. A idade dos animais no dia da autópsia não deve ser superior a 70 dias. Esta flexibilidade permite que os laboratórios programem com eficiência o trabalho experimental.

Aleatorização do peso corporal e dos grupos

31. As diferenças de peso corporal de rato para rato são uma fonte de variabilidade do peso dos tecidos em cada grupo e entre os grupos de animais. O aumento da variabilidade do peso dos tecidos faz aumentar o coeficiente de variação e diminui o poder estatístico do ensaio (por vezes designado «sensibilidade do ensaio»). Importa, portanto, limitar as variações de peso corporal, tanto no plano experimental como no plano estatístico.

32. No plano experimental, é necessário reduzir as diferenças de peso corporal em cada grupo e entre os grupos em estudo. Em primeiro lugar, os animais anormalmente pequenos ou anormalmente grandes não devem participar no estudo. No início do estudo, as diferenças de peso entre animais não devem exceder ± 20 % do peso médio (por exemplo, 175 g ± 35 g no caso dos ratos peripúberes castrados). Em segundo lugar, integram-se os animais nos grupos expostos e de controlo procedendo a uma distribuição aleatória de pesos, de maneira que o peso corporal médio de cada grupo não difira estatisticamente do peso corporal médio de qualquer outro grupo. Deve mencionar-se no relatório o protocolo de aleatorização por blocos utilizado.

▼M5

33. Dado que a toxicidade pode diminuir o peso corporal dos animais dos grupos expostos comparativamente ao dos animais dos grupos de controlo, pode utilizar-se como covariável estatística o peso corporal no primeiro dia de administração do produto químico em estudo — e não o peso corporal no dia da autópsia.

Dosagem

34. Normalmente, dois grupos de dosagem do produto químico em estudo, juntamente com um grupo de controlo positivo e um grupo de controlo do veículo (negativo) (ver o ponto 43), são suficientes para determinar se o produto químico pode ter atividade androgénica *in vivo*. Por razões de bem-estar animal, privilegia-se, portanto, este modelo. No caso de se pretender traçar uma curva da relação entre a dose administrada e a resposta obtida ou efetuar uma extrapolação para doses mais baixas, são necessários, pelo menos, três grupos de dosagem. No caso de se pretender obter informações que vão além de uma identificação de atividade androgénica (como, por exemplo, uma estimativa do poder androgénico), deve ponderar-se um regime de dosagem diferente. Na despistagem de antiandrogénios, administra-se o produto químico em estudo juntamente com um agonista de androgénios de referência. Neste caso, devem utilizar-se, pelo menos, três grupos, expostos a doses diferentes do produto químico em estudo, juntamente com um grupo de controlo positivo e um grupo de controlo negativo (ver o ponto 44). Salvo no que respeita à exposição ao produto químico em estudo, os animais dos grupos de controlo devem ser tratados do mesmo modo que os animais dos grupos ensaiados. Se for utilizado um veículo para administrar o produto químico em estudo, os animais do grupo de controlo devem receber o volume máximo de veículo utilizado nos grupos ensaiados.

35. Na escolha das doses devem ter-se em conta os dados eventualmente disponíveis sobre a toxicidade e a (toxico)cinética do produto químico em estudo ou de matérias afins. Para se estabelecer o nível de dose mais elevado, deve atender-se, em primeiro lugar, à DL_{50} e/ou aos dados sobre toxicidade aguda de que se disponha, a fim de evitar a morte dos animais e de os poupar a grande sofrimento ou aflição (17)(18)(19)(20), e, em segundo lugar, às informações disponíveis sobre as doses utilizadas em estudos de toxicidade subcrónica ou crónica. Em geral, a dose mais elevada não deve provocar uma redução do peso corporal final dos animais superior a 10 % do peso dos animais do grupo de controlo. A dose mais elevada deve ser 1) a dose máxima à qual os animais sobrevivem e que não lhes causa efeitos tóxicos nem sofrimento significativos após dez dias consecutivos de administração, sem exceder a dose máxima diária de 1 000 mg/kg (ver o ponto 36), ou 2) uma dose inferior indutora de efeitos (anti)androgénicos. A título exploratório, aceitam-se intervalos largos (por exemplo, meia unidade logarítmica, correspondente a um fator de progressão das doses de 3,2, ou mesmo uma unidade logarítmica) entre as doses administradas. Se não se dispuser de dados adequados para o efeito, pode efetuar-se um estudo exploratório (ver o ponto 37), para facilitar a determinação das doses a utilizar.

Dose-limite

36. Se o ensaio da dose-limite de 1 000 mg diários por quilograma de peso corporal e de uma dose inferior a esta, aplicando os protocolos descritos para este estudo, não gerar uma diferença estatisticamente significativa entre os pesos correspondentes dos órgãos reprodutores, pode considerar-se desnecessário ensaiar outras doses. A dose-limite aplica-se a todos os casos, exceto se os dados relativos à exposição humana aconselharem o ensaio de doses superiores.

Estudo exploratório

37. Se necessário, pode efetuar-se um estudo exploratório preliminar com poucos animais, para escolher os grupos de dosagem apropriados [recorrendo aos métodos de ensaio da toxicidade aguda — capítulos B.1.bis e B.1.tris deste anexo (27), *Test Guideline* 425 da OCDE (19)]. O objetivo, no caso do bioensaio de Hershberger, é selecionar doses que garantam a sobrevivência dos animais e não lhes provoquem efeitos tóxicos nem sofrimento significativos após dez dias consecutivos de administração do produto químico, até à dose-limite diária de 1 000 mg/kg como referido nos pontos 35

▼M5

e 36. Para o efeito, pode utilizar-se um documento de orientações da OCDE (17) que define os sinais clínicos da toxicidade ou do sofrimento provocados em animais. Se for possível fazê-lo nesse estudo exploratório, após dez dias de administração das doses procede-se à excisão e pesagem dos tecidos-alvo cerca de 24 horas após a última dose. Estes dados podem ser depois utilizados para escolher as doses a utilizar no estudo principal.

Produtos químicos de referência e veículo

38. O agonista de androgénios de referência é o propionato de testosterona (n.º CAS 57-82-5). A dose deste agonista de referência pode ser 0,2 mg ou 0,4 mg diários por quilograma de peso corporal. O antagonista de androgénios de referência é a flutamida (n.º CAS 1311-84-7). A dose deste antagonista de referência, coadministrada com a dose do propionato de testosterona de referência, deve ser de 3 mg diários por quilograma de peso corporal.

39. Sempre que possível, deve começar por ponderar-se a possibilidade de se utilizarem soluções/suspensões aquosas. Porém, dado que os ligandos de androgénios ou os precursores metabólicos dos mesmos são geralmente hidrófobos, normalmente utiliza-se uma solução ou suspensão oleosa (por exemplo, em óleo de milho, de amendoim ou de gergelim ou em azeite). Pode dissolver-se o produto químico em estudo numa quantidade mínima de etanol a 95 % ou de outro solvente adequado, diluindo-se depois até à concentração final no veículo a utilizar nos ensaios. É necessário conhecer as características de toxicidade do solvente e verificá-las num grupo de controlo apenas exposto ao solvente. Se o produto químico em estudo for considerado estável, pode favorecer-se a sua dissolução aquecendo ligeiramente e agitando vigorosamente. Deve determinar-se a estabilidade do produto químico em estudo no veículo utilizado. Se o produto químico em estudo se mantiver estável durante todo o estudo, podem preparar-se uma alíquota inicial do mesmo e, diariamente, as diluições às doses necessárias, tomando as precauções necessárias para evitar a contaminação ou a deterioração das amostras.

Administração das doses

40. Administra-se o propionato de testosterona por injeção subcutânea e a flutamida por sonda esofágica.

41. Administra-se o produto químico em estudo por sonda esofágica ou por injeção subcutânea. Ao escolher a via de administração, é necessário atender aos aspetos do bem-estar animal e ter em conta as propriedades físico-químicas do produto químico em estudo. Além disso, caso se obtenham resultados positivos por injeção, deve atender-se a aspetos toxicológicos como a relação com a via de exposição humana ao produto químico (por exemplo, sonda esofágica para exposição por ingestão e injeção subcutânea para exposição por inalação ou por adsorção cutânea), bem como às informações toxicológicas e aos dados metabólicos e cinéticos disponíveis (por exemplo, a necessidade de evitar metabolismos de primeira passagem ou melhor eficiência de uma determinada via de administração), antes de efetuar ensaios aprofundados a longo prazo.

42. Devem administrar-se as doses aos animais da mesma maneira e com a mesma cronologia durante dez dias consecutivos, com intervalos de aproximadamente 24 horas. A dosagem deve ajustar-se diariamente com base nas determinações quotidianas concomitantes do peso corporal. Deve registar-se o volume e o momento da administração de cada dose em cada dia de exposição A dose máxima indicada no ponto 35 não deve ser excedida, a fim de possibilitar uma interpretação com significado dos dados. Nessa perspetiva, devem avaliar-se cuidadosamente as reduções de peso corporal, os sinais clínicos e outros dados obtidos. A administração forçada aos animais através de sonda esofágica deve efetuar-se por meio de um tubo estomacal ou de uma cânula de intubação adequada. O volume máximo de

▼M5

líquido que pode ser administrado de cada vez depende do tamanho do animal. Devem respeitar-se as normas locais de manipulação de animais, mas o volume administrado não deve exceder 5 ml por quilograma de peso corporal, salvo no caso das soluções aquosas, em que se permitem 10 ml por quilograma de peso corporal. No caso das injeções subcutâneas, as doses devem ser administradas na região escapular dorsal ou na região lombar, por meio de uma seringa do tipo utilizado no teste da tuberculina (calibre 23 ou 25), dotada de uma agulha esterilizada. É facultativo rapar a pelagem dos animais no local da injeção. Devem registar-se as perdas ou escorrimentos nesse local, bem como todas as administrações incompletas de doses. O volume injetado diariamente a um rato não deve exceder 0,5 ml por quilograma de peso corporal.

Protocolo específico para agonistas de androgénios

43. No ensaio de agonistas de androgénios, o veículo deve ser utilizado como controlo negativo e o grupo exposto ao propionato de testosterona como controlo positivo. Verifica-se se o produto químico em estudo tem atividade biológica de agonista de androgénios administrando as doses escolhidas do mesmo a grupos de animais durante dez dias consecutivos. Compara-se o peso de cada um dos cinco tecidos acessórios do aparelho sexual dos animais dos grupos expostos ao produto químico em estudo com o dos animais do grupo de controlo do veículo, a fim de determinar se houve algum aumento de peso com significado estatístico.

Protocolo específico para antagonistas de androgénios e inibidores da 5α-redutase

44. No ensaio de antagonistas de androgénios e de inibidores da 5α-redutase, o grupo exposto ao propionato de testosterona constitui o controlo negativo e o grupo coadministrado com doses de referência de propionato de testosterona e flutamida constitui o controlo positivo. Verifica-se a existência de atividade biológica de antagonista de androgénios e de inibidor da 5α-redutase administrando o produto químico em estudo durante dez dias consecutivos, juntamente com uma dose de referência de propionato de testosterona. Compara-se o peso de cada um dos cinco tecidos acessórios do aparelho sexual dos animais dos grupos expostos ao produto químico em estudo e ao propionato de testosterona com o dos animais do grupo exposto unicamente ao propionato de testosterona de referência, a fim de determinar se houve alguma diminuição de peso com significado estatístico.

EXAMES

Exames clínicos

45. Deve efetuar-se um exame clínico geral pelo menos uma vez por dia; se forem detetados sinais de toxicidade, o exame deve ser mais frequente. De preferência, os exames devem ser efetuados à mesma hora ou às mesmas horas do dia, tendo em atenção o período previsto de efeitos mais acentuados após a administração do produto químico. Devem examinar-se todos os animais de modo a detetar os casos de mortalidade e morbilidade e sinais clínicos gerais como mudanças de comportamento, alterações da pele, da pelagem, dos olhos ou das mucosas e a ocorrência de secreções ou excreções e de reações neurovegetativas (por exemplo lacrimação, horripilação, alterações da dimensão pupilar, respiração anormal, etc.).

46. Os animais que morram devem ser retirados e eliminados sem análise de dados. Devem indicar-se no relatório do estudo a mortalidade de animais antes da autópsia e as razões aparentes de cada morte. Os animais moribundos devem ser eutanasiados. Os animais eutanasiados por estarem moribundos devem ser indicados no relatório do estudo, juntamente com as razões aparentes da morbilidade.

▼M5

Peso corporal e consumo de alimentos

47. Deve pesar-se diariamente cada animal com a aproximação de 0,1 g, começando imediatamente antes do início da exposição, isto é, quando da repartição dos animais pelos grupos. A quantidade de alimentos consumida em cada gaiola durante o período de exposição pode também ser determinada por gaiola, a título facultativo, pesando os distribuidores de alimentos. Os resultados de consumo de alimentos devem ser expressos em gramas diários por animal.

Dissecação e pesagem dos tecidos e órgãos

48. Aproximadamente 24 horas após a última administração do produto químico em estudo, eutanasiam-se e sangram-se os ratos pelo procedimento normal do laboratório, passando-se em seguida à autópsia. O método de eutanásia deve ser referido no relatório do laboratório.

49. Idealmente, a ordem das autópsias deve ser aleatória no universo dos grupos, evitando seguir uma ordem crescente ou decrescente das doses, método que poderia afetar os resultados. As constatações da autópsia, por exemplo modificações patológicas e lesões visíveis, devem ser anotadas e posteriormente referidas no relatório.

50. Devem pesar-se os cinco tecidos dependentes dos androgénios (próstata ventral, vesículas seminais, incluindo as glândulas coagulantes, complexo formado pelos músculos elevatórios do ânus e bulbocavernosos, glândulas de Cowper e glande peniana). Para isso, excisam-se os tecidos em causa, retiram-se cuidadosamente os outros tecidos e a gordura aderentes e determinam-se os respetivos pesos em fresco (tecidos não fixados). Cada tecido deve ser manipulado com cuidados especiais para evitar perdas de fluidos e a secagem do mesmo, que, ao reduzirem os pesos registados, podem introduzir erros e variabilidade significativos. Alguns tecidos podem ter dimensões muito reduzidas ou ser difíceis de dissecar, ambas as circunstâncias fonte de variabilidade. É, portanto, importante que os dissecadores dos tecidos acessórios do aparelho sexual estejam familiarizados com procedimentos normalizados de dissecação dos mesmos. A OCDE publicou um manual de procedimentos normalizados de dissecação (21). Uma formação cuidadosa baseada nesse manual minimizará esta fonte potencial de variabilidade no estudo. Idealmente, o prossector de um dado tecido deve ser sempre o mesmo, para eliminar as diferenças de pessoa para pessoa no tratamento dos tecidos. Se isso não for possível, o programa das autópsias deve ser organizado de modo que cada prossector fique incumbido de dissecar um determinado tecido de todos os grupos expostos e não de modo que um prossector fique incumbido de dissecar todos os tecidos do(s) grupo(s) de controlo, ficando outro incumbido dos grupos expostos. Deve pesar-se cada tecido acessório do aparelho sexual com a aproximação de 0,1 mg, sem o desumedecer previamente, registando os pesos obtidos para cada animal.

51. Alguns tecidos podem ter dimensões muito reduzidas ou ser difíceis de dissecar, ambas as circunstâncias fonte de variabilidade. Estudos anteriores revelaram que o intervalo dos coeficientes de variação obtidos parece depender da competência do laboratório. Em alguns casos, obtiveram-se grandes diferenças nos pesos absolutos dos tecidos, nomeadamente da próstata ventral e das glândulas de Cowper, determinados no mesmo laboratório.

52. A pesagem do fígado, dos rins e das glândulas suprarrenais é facultativa. Novamente, devem retirar-se todas as aderências de tecidos fasciais ou de gordura. O fígado deve ser pesado e o seu peso registado com a aproximação de 0,1 g; os rins e as glândulas suprarrenais, com a aproximação de 0,1 mg. O fígado, os rins e as glândulas suprarrenais não são influenciadas pelos androgénios, mas também fornecem indicadores úteis de toxicidade sistémica.

▼M5

53. A determinação dos teores séricos de hormona luteinizante (LH), de hormona foliculoestimulante (FSH) e de testosterona (T) é facultativa. Os teores séricos de testosterona são úteis para determinar se o produto químico em estudo induz o metabolismo hepático da testosterona, baixando os níveis séricos desta. Sem estes dados relativos à testosterona, esse efeito poderia parecer advir de um mecanismo antiandrogénico. Os teores de hormona luteinizante dão informações acerca da capacidade de um antiandrogénio, não apenas de reduzir o peso dos órgãos, mas também de afetar a função do eixo hipotálamo-hipófise, o que, segundo estudos a longo prazo, pode induzir tumores nos testículos. A hormona foliculoestimulante é importante na espermatogénese. A determinação dos teores séricos de T4 e T3 são igualmente análises facultativas capazes de fornecer informações complementares úteis acerca da capacidade de desregulação da homeostase das hormonas tiroideias. No caso de se pretender efetuar análises hormonais, anestesiam-se os ratos antes da autópsia e colhem-se amostras de sangue por punção cardíaca. O método de anestesia deve ser escolhido com cuidado, para que não afete as análises hormonais. Devem indicar-se no relatório o método de preparação do soro, a proveniência dos *kits* para os ensaios radioimunológicos ou para outras técnicas de medição, os protocolos analíticos e os resultados obtidos. Os teores de hormona luteinizante e de testosterona devem ser indicados em nanogramas por mililitro de soro.

54. Descreve-se a seguir o modo de proceder à dissecação dos tecidos, baseado no guia pormenorizado da dissecação, com fotografias, que foi publicado como suplemento no âmbito do programa de validação (21). A página Web da *Food and Drug Administration* da Coreia contém igualmente uma hiperligação para uma filmagem de uma dissecação (22).

— Com o ventre do animal voltado para cima, verificar se o prepúcio está descolado da glande peniana. Se assim for, recolher o prepúcio e cortar a glande, pesando-a com a aproximação de 0,1 mg e registando o peso determinado.

— Efetuar um corte na pele e na parede abdominais, de modo a expor as vísceras. Se estiver prevista a pesagem dos órgãos facultativos, retirar o fígado, pesando-o com a aproximação de 0,1 g; em seguida, retirar o estômago e os intestinos e depois os rins e as glândulas suprarrenais, pesando-as aos pares com a aproximação de 0,1 mg. Esta dissecação expõe a bexiga e constitui o início da dissecação dos tecidos-alvo acessórios do aparelho sexual.

— Para dissecar a próstata ventral, separar a bexiga da camada muscular ventral cortando o tecido conjuntivo ao longo da linha mediana. Deslocar a bexiga no sentido anterior, para o lado das vesículas seminais, de modo a mostrar os lóbulos esquerdo e direito da próstata ventral (cobertos por uma camada de gordura). Raspar cuidadosamente a gordura dos lóbulos esquerdo e direito da próstata ventral. Afastar cuidadosamente da uretra o lóbulo direito, dissecando-o daquela. Segurando o lóbulo direito da próstata ventral, afastar cuidadosamente da uretra o lóbulo esquerdo, dissecando-o igualmente daquela. Pesar com a aproximação de 0,1 mg e registar o peso.

— Para dissecar as vesículas seminais juntamente com as glândulas coagulantes, deslocar a bexiga no sentido caudal, expondo os canais deferentes e os lóbulos esquerdo e direito do conjunto formado pelas vesículas seminais e pelas glândulas coagulantes. Para evitar fugas de fluidos, aplicar uma pinça homeostática na base deste conjunto, na confluência com a uretra. Dissecar cuidadosamente as vesículas seminais e as glândulas coagulantes; mantendo as pinças aplicadas, remover a gordura e os tecidos aderentes; colocar os tecidos-alvo numa cápsula de pesagem previamente tarada, retirar as pinças e pesar com a aproximação de 0,1 mg, registando o peso obtido.

▼M5

— Para dissecar o complexo formado pelos músculos elevatórios do ânus e bulbocavernosos, é necessário expor esses músculos e a base do pénis. Os músculos elevatórios do ânus rodeiam o cólon, ao passo que a parte anterior dos mesmos e os músculos bulbocavernosos estão ligados aos bolbos penianos. Remove-se a pele e os tecidos aderentes da região perianal que se estende da base do pénis à extremidade anterior do ânus. Dissecam-se gradualmente os músculos bulbocavernosos dos bolbos penianos e dos outros tecidos. Corta-se o cólon em dois, podendo assim dissecar-se e remover-se todo o complexo formado pelos músculos elevatórios do ânus e bulbocavernosos. Removem-se a gordura e os tecidos aderentes a esses músculos e pesam-se estes últimos com a aproximação de 0,1 mg, registando o peso obtido.

— Depois de removido o complexo formado pelos músculos elevatórios do ânus e bulbocavernosos, ficam visíveis as glândulas de Cowper ou bulbouretrais, de forma arredondada, situadas na base dos bolbos penianos, em posição ligeiramente dorsal. É necessário proceder cuidadosamente à dissecação, para evitar danificar a cápsula, cuja superfície é fina, e assim impedir a fuga de fluidos. Pesar o conjunto das duas glândulas de Cowper com aproximação de 0,1 mg e registar o peso obtido.

— Se houver alguma perda de fluidos de alguma glândula durante a autópsia e a dissecação é necessário referi-lo no relatório.

55. Se a avaliação de um produto químico exigir a autópsia de mais animais do que é razoável programar para um só dia, o início do estudo pode ser estendido por dois dias consecutivos, o mesmo sucedendo às autópsias e às operações conexas destas. No caso de se proceder deste modo, deve utilizar-se por dia metade dos animais de cada grupo exposto.

56. Depois da autópsia, as carcaças devem ser eliminadas de modo adequado.

RELATÓRIOS

Dados

57. Os dados devem ser individualizados (isto é, devem ser indicados por animal o peso corporal, o peso de cada tecido acessório do aparelho sexual, as medições facultativas e as outras respostas e observações) e por grupo de animais (com indicação das médias e dos desvios-padrão de todas as medições efetuadas). Devem ser resumidos em quadros e deles devem constar o número de animais no início do ensaio, o número de animais que morreram ou apresentaram sinais de toxicidade durante o ensaio e uma descrição dos sinais de toxicidade observados, nomeadamente o momento do seu aparecimento e a sua duração e intensidade.

58. Informações a constar do relatório final:

Instalações nas quais se realizaram os ensaios

— nome e localização das instalações;

— diretor do estudo e outro pessoal e responsabilidades de cada um no estudo;

— datas de início e termo do estudo, isto é, primeiro dia de administração do produto químico e último dia de autópsia.

Produto químico em estudo

— proveniência, número de lote, identidade, grau de pureza, endereço completo do fornecedor e caracterização do produto ou produtos químicos em estudo;

— natureza física e propriedades físico-químicas pertinentes;

— condições de armazenagem; método e frequência de preparação de diluições;

— dados obtidos sobre a estabilidade;

— análises das soluções ou suspensões administradas.

▼**M5**

Veículo

— caracterização do veículo utilizado no estudo (identidade, fornecedor e número do lote);

— justificação da escolha do veículo (se não for água).

Animais estudados e condições em que são mantidos

— espécie e estirpe utilizadas e justificação das opções tomadas;

— proveniência ou fornecedor dos animais, incluindo o endereço completo;

— número e idade dos animais fornecidos;

— condições de alojamento (temperatura, iluminação, etc.);

— dieta (nome, tipo, fornecedor, número de lote, composição e, se conhecidos, níveis de fitoestrogénios);

— camas (nome, tipo, fornecedor e composição);

— condições de engaiolamento e número de animais por gaiola.

Condições de realização dos ensaios

— idade dos animais no momento da castração e duração da aclimatação após a castração;

— peso de cada animal no início do estudo (com a aproximação de 0,1 g);

— processo de aleatorização, registo da integração dos animais nos grupos do veículo, do produto químico de referência e do produto químico em estudo e registo da distribuição dos animais pelas gaiolas;

— média e desvio-padrão dos pesos corporais correspondentes a cada grupo, para cada dia de pesagem ao longo do estudo;

— fundamentação da escolha das doses;

— via de administração do produto químico em estudo e fundamentação da via de exposição escolhida;

— ensaios de antiandrogenicidade: dose e volume utilizados de propionato de testosterona;

— doses e volumes utilizados para a exposição ao produto químico em estudo;

— cronologia da administração das doses;

— procedimentos de autópsia, incluindo os meios de sangramento e as anestesias;

— se forem efetuadas análises do soro, elementos relativos aos métodos utilizados; por exemplo, caso seja utilizado um método radioimunométrico (RIA), indicar a proveniência dos *kits*, a data de validade destes, o método de contagem da cintilação e o método de normalização.

Resultados

— Exame diário da cada animal durante o período de administração das doses, incluindo, nomeadamente:

— peso corporal (com a aproximação de 0,1 g),

— eventuais sinais clínicos,

— medições ou anotações relativas ao consumo de alimentos;

— Autópsia de cada animal, incluindo, nomeadamente:

▼M5

— data da autópsia,

— grupo de exposição no qual o animal estava integrado,

— identificação do animal,

— prossector,

— hora da realização da autópsia e da dissecação,

— idade do animal,

— peso corporal final no momento da autópsia (anotar algum aumento ou diminuição com significado estatístico),

— ordem de sangramento e dissecação dos animais na autópsia,

— peso de cada um dos cinco tecidos-alvo dependentes dos androgénios:

— próstata ventral (com a aproximação de 0,1 mg),

— vesículas seminais e glândulas coagulantes, incluindo os fluidos (o par, com a aproximação de 0,1 mg),

— complexo dos músculos elevatórios do ânus e bulbocavernosos (com a aproximação de 0,1 mg),

— glândulas de Cowper (peso fresco — o par, com a aproximação de 0,1 mg),

— glande peniana (peso fresco, com a aproximação de 0,1 mg),

— peso de cada tecido facultativo, se determinado:

— fígado (com a aproximação de 0,1 g),

— rins (o par, com a aproximação de 0,1 mg),

— glândulas suprarrenais (o par, com a aproximação de 0,1 mg),

— comentários e observações gerais;

— Análises das hormonas séricas, se efetuadas:

  — hormona luteinizante sérica (facultativa, ng por ml de soro),

  — testosterona sérica (facultativa, ng por ml de soro),

— comentários e observações gerais.

Resumo dos dados

Os dados devem ser resumidos em quadros que indiquem a dimensão da amostra para cada grupo, o valor médio e o desvio-padrão ou o erro-padrão da média. Os quadros devem incluir os pesos corporais na autópsia, as variações do peso corporal desde o início da exposição até à autópsia, os pesos dos tecidos-alvo acessórios do aparelho sexual e os eventuais pesos de órgãos facultativos.

Discussão dos resultados

Análise dos resultados

59. Os pesos corporais e dos órgãos apurados na autópsia devem ser objeto de uma análise estatística destinada a determinar características como a homogeneidade da variância, se necessário mediante uma transformação adequada dos dados. Devem comparar-se os grupos expostos com um grupo de controlo, recorrendo a técnicas como a ANOVA (análise da variância), seguida de comparações par a par (por exemplo, o teste unilateral de Dunnett) e da aplicação de um critério de diferença estatística, por exemplo $p \leq 0,05$. Devem identificar-se os grupos com significado estatístico. Devem evitar-se pesos de órgãos «relativos», dada a invalidade dos pressupostos estatísticos em que se fundamenta esta manipulação de dados.

▼**M5**

60. O grupo de controlo a utilizar no estudo do agonismo de androgénios deve ser um grupo exposto unicamente ao veículo. As características do modo de ação de um determinado produto químico podem gerar respostas relativas diferentes de tecido para tecido. A trembolona, por exemplo, que não sofre os efeitos da 5α-redutase, afeta mais o complexo formado pelos músculos elevatórios do ânus e bulbocavernosos e a glande peniana do que o propionato de testosterona. Um aumento com significado estatístico ($p \leq 0,05$) do peso de quaisquer dois ou mais dos cinco tecidos-alvo dependentes dos androgénios (próstata ventral, complexo formado pelos músculos elevatórios do ânus e bulbocavernosos, glande peniana, glândulas de Cowper e vesículas seminais, com as glândulas coagulantes) deve ser considerado um resultado positivo de agonista de androgénios (nesse caso, todos os tecidos-alvo devem apresentar algum grau de aumento do crescimento). Pode realizar-se uma avaliação combinada das respostas dos tecidos dos órgãos acessórios do aparelho sexual efetuando uma análise multivariada dos dados. Este método pode servir para afinar as conclusões, sobretudo nos casos em que apenas um tipo de tecido dê uma resposta com significado estatístico.

61. O grupo de controlo a utilizar no estudo do antagonismo de androgénios deve ser um grupo exposto ao androgénio de referência (unicamente propionato de testosterona). As características do modo de ação de um determinado produto químico podem gerar respostas relativas diferentes de tecido para tecido. Comparativamente a antagonistas muito ativos de recetores de androgénios, como a flutamida, os inibidores da 5α-redutase, como a finasterida, afetam mais a próstata ventral do que os outros tecidos. Uma redução com significado estatístico ($p \leq 0,05$) do peso de quaisquer dois ou mais dos cinco tecidos-alvo dependentes dos androgénios (próstata ventral, complexo formado pelos músculos elevatórios do ânus e bulbocavernosos, glande peniana, glândulas de Cowper e vesículas seminais, com as glândulas coagulantes), comparativamente à exposição unicamente ao propionato de testosterona, deve ser considerada um resultado positivo de antagonista de androgénios (nesse caso, todos os tecidos-alvo devem apresentar algum grau de diminuição do crescimento). Pode realizar-se uma avaliação combinada das respostas dos tecidos dos órgãos acessórios do aparelho sexual efetuando uma análise multivariada dos dados. Este método pode servir para afinar as conclusões, sobretudo nos casos em que apenas um tipo de tecido dê uma resposta com significado estatístico.

62. Os dados devem ser resumidos em quadros que indiquem o valor médio, o erro-padrão da média (o desvio-padrão também é aceitável) e a dimensão da amostra para cada grupo. Devem ser igualmente facultados quadros com os dados individualizados. Devem analisar-se os valores individualizados, as médias, os erros-padrão (ou desvios-padrão) e os coeficientes de variação dos dados relativos aos grupos de controlo, para determinar se satisfazem critérios aceitáveis de coerência com os valores históricos correspondentes. Se os coeficientes de variação excederem os valores indicados no quadro 1 (ver os pontos 25 e 26) para o peso de cada órgão, deve verificar-se se há erros no registo ou na transcrição dos dados ou se o laboratório ainda não domina a dissecação correta dos tecidos dependentes dos androgénios, sendo necessária mais prática ou mais formação. Em geral, os coeficientes de variação (quociente do desvio-padrão pelo peso médio do órgão) são reprodutíveis de laboratório para laboratório e de estudo para estudo. Os dados apresentados devem ser, pelo menos, os seguintes: pesos da próstata ventral, das vesículas seminais, do complexo formado pelos músculos elevatórios do ânus e bulbocavernosos, das glândulas de Cowper, da glande peniana e do fígado, peso corporal e variação deste entre o início da exposição e a autópsia. Os dados também podem ser apresentados depois de um ajustamento de covariância em função do peso corporal, mas tal não dispensa a apresentação dos dados não-ajustados. Além disso, se em algum dos grupos não tiver ocorrido o descolamento do prepúcio, deve registar-se a incidência desse descolamento e comparar-se estatisticamente esta última com a do grupo de controlo, utilizando um teste exato de Fisher.

▼**M5**

63. Ao verificar a concordância entre os dados inseridos no computador e os constantes das folhas de dados originais, deve estar-se especialmente atento a valores de pesos de órgãos que não sejam biologicamente plausíveis ou se afastem mais de três desvios-padrão da média pertinente do grupo exposto em causa, podendo ser necessário rejeitá-los por serem provavelmente erros de registo.

64. A comparação dos resultados do estudo com os valores de coeficiente de variação determinados pela OCDE (quadro 1) constitui frequentemente uma etapa importante na interpretação da validade dos resultados do estudo. Os laboratórios devem conservar dados históricos dos grupos de controlo do veículo. Devem conservar igualmente dados históricos das respostas a produtos químicos de referência positivos, como o propionato de testosterona e a flutamida. Os laboratórios podem determinar periodicamente a resposta a agonistas e antagonistas reconhecidamente fracos de androgénios, devendo, nesse caso, conservar também tais dados. Estes dados podem ser comparados com dados disponíveis da OCDE, para garantir que os métodos aplicados pelo laboratório têm precisão e poder estatísticos suficientes.

▼**M5**

Apêndice 1

DEFINIÇÕES

Androgénico: termo usado para designar uma influência positiva no crescimento de tecidos dependentes dos androgénios.

Antiandrogénico: produto químico capaz de suprimir a ação do propionato de testosterona num mamífero.

Produto químico: substância ou mistura.

Data de nascimento: dia 0 após o nascimento.

Dose: quantidade de produto químico em estudo administrada. No bioensaio de Hershberger, exprime-se em peso diário do produto químico em estudo por unidade de peso corporal do animal ensaiado (por exemplo, mg/kg de peso corporal/dia).

Dosagem: termo geral que abrange a dose, a frequência desta e a duração da administração da mesma.

Moribundo: termo usado para designar um animal que está quase a morrer.

X dias após o nascimento: número X de dias de vida após o dia de nascimento.

Sensibilidade: capacidade de um método de ensaio de identificar corretamente produtos químicos que possuam a propriedade em estudo.

Especificidade: capacidade de um método de ensaio de identificar corretamente produtos químicos que não possuam a propriedade em estudo.

Produto químico em estudo: qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado este método de ensaio.

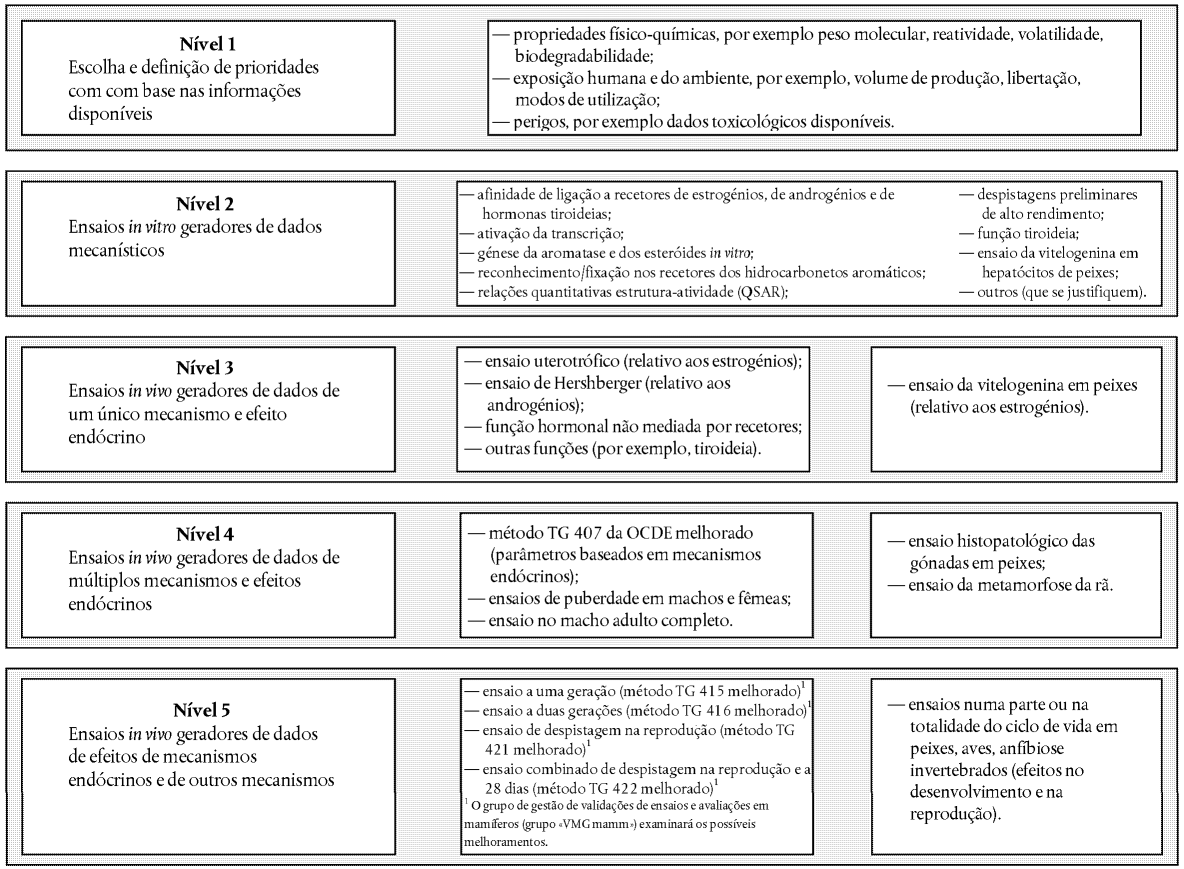
Validação: processo científico concebido para caracterizar as limitações e as condições operatórias dos métodos de ensaio e para demonstrar a fiabilidade e a pertinência dos mesmos para determinado fim.

▼M5

Apêndice 2

Nota: Documento elaborado pelo Secretariado do *Test Guidelines Programme*da OCDE com base no acordo alcançado na 6.ª reunião da *Task Force* para o ensaio e a avaliação de desreguladores do sistema endócrino (EDTA)

Quadro concetual da OCDE para ensaio e avaliação de produtos químicos desreguladores do sistema endócrino



02008R0440 — PT — 16.10.2019 — 008.001 — 934

▼**M5**

NOTAS EXPLICATIVAS DO QUADRO CONCEPTUAL

Nota 1: É possível entrar no quadro e dele sair em qualquer nível, consoante a natureza das informações necessárias para a avaliação dos perigos e dos riscos.

Nota 2: No nível 5, os métodos ecotoxicológicos devem integrar parâmetros indicativos dos mecanismos dos efeitos indesejáveis e dos mecanismos das consequências negativas potenciais nas populações.

Nota 3: Se um modelo multimodal abranger vários dos ensaios de parâmetro único, esse modelo substituirá estes últimos.

Nota 4: A avaliação de cada produto químico deve basear-se numa análise caso a caso que tenha em conta todas as informações disponíveis, tendo presente a função dos níveis do quadro.

Nota 5: Esta versão do quadro não deve ser considerada exaustiva. Nos níveis 3, 4 e 5, integra ensaios já disponíveis ou em validação. Estes últimos são incluídos a título provisório. Logo que estejam afinados e validados, serão formalmente integrados no quadro.

Nota 6: Os ensaios integrados no nível 5 não devem considerar-se unicamente de caráter definitivo. Os ensaios em questão contribuem para a avaliação geral dos perigos e dos riscos.

REFERÊNCIAS

1. OCDE (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force. 10 e 11 de março de 1998. ENV/MC/CHEM/RA(98)5.

2. Dorfman R.I. (1962). Standard methods adopted by official organization. Academic Press, NY.

3. Gray L.E. Jr., Furr J., Ostby J.S. (2005). Hershberger assay to investigate the effects of endocrine disrupting compounds with androgenic and anti-androgenic activity in castrate-immature male rats. Em: *Current Protocols in Toxicology* 16.9.1-16.9.15. J Wiley and Sons Inc.

4. OCDE (2006). Final OECD report of the initial work towards the validation of the rat Hershberger assay. Phase 1. Androgenic response to testosterone propionate and anti-androgenic effects of flutamide. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment N.º 62. ENV/ /JM/MONO(2006)30.

5. OCDE (2008). Report of the OECD Validation of the Rat Hershberger Bioassay: Phase 2: Testing of Androgen Agonists, Androgen Antagonists and a 5a-Reductase Inhibitor in Dose Response Studies by Multiple Laboratories. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment N.º 86. ENV/JM/MONO(2008)3.

6. OCDE (2007). Report of the Validation of the Rat Hershberger Assay: Phase 3: Coded Testing of Androgen Agonists, Androgen Antagonists and Negative Reference Chemicals by Multiple Laboratories. Surgical Castrate Model Protocol. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment N.º 73. ENV/JM/MONO(2007)20.

7. Owens, W., Zeiger E., Walker M., Ashby J., Onyon L., Gray, Jr., L.E. (2006). The OECD programme to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses. Phase 1: Use of a potent agonist and a potent antagonist to test the standardized protocol. *Env. Health Persp.* 114:1265-1269.

▼M5

8. Owens W., Gray L.E., Zeiger E., Walker M., Yamasaki K., Ashby J., Jacob E. (2007). The OECD program to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses: phase 2 dose-response studies. *Environ Health Perspect.* 115(5):671-8.

9. Korenchevsky V. (1932). The assay of testicular hormone preparations. *Biochem J.* 26:413-422.

10. Korenchevsky V., Dennison M., Schalit R. (1932). The response of castrated male rats to the injection of the testicular hormone. *Biochem J.* 26:1306-1314.

11. Eisenberg E., Gordan G.S. (1950). The levator ani muscle of the rat as an index of myotrophic activity of steroidal hormones. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 99:38-44.

12. Eisenberg E., Gordan G.S., Elliott H.W. (1949). Testosterone and tissue respiration of the castrate male rat with a possible test for mytrophic activity. *Endocrinology* 45:113-119.

13. Hershberger L., Shipley E., Meyer R. (1953). Myotrophic activity of 19--nortestosterone and other steroids determined by modified levator ani muscle method. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 83:175-180.

14. Hilgar A.G., Vollmer E.P. (1964). Endocrine bioassay data: Androgenic and myogenic. United States Public Health Service, Washington DC.

15. Dorfman R.I. (1969). Androgens and anabolic agents. Em: Methods in Hormone Research, volume IIA. (Dorfman R.I., editores). New York:Academic Press, 151-220.

16. Massaro E.J. (2002). Handbook of Neurotoxicology, volume I. New York:Humana Press, p. 38.

17. OCDE (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 19. ENV/JM/MONO(2000)7.

18. OCDE (1982). Organization for Economic Co-operation and Development — Principles of Good Laboratory Practice. ISBN 92-64-12367-9. Paris.

19. OCDE (2008). Acute oral toxicity — up-and-down procedure. OECD Guideline for the testing of chemicals No 425.

20. OCDE (2001). Guidance document on acute oral toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 24. ENV/JM/MONO(2001)4.

21. Supplemental materials for Owens et al. (2006). The OECD programme to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses. Phase 1: Use of a potent agonist and a potent antagonist to test the standardized protocol. *Env. Health Persp.* 114:1265-1269. Ver a secção II: The dissection guidance provided to the laboratories: http://www.ehponline.org/docs/2006/8751/suppl.pdf

22. Korea Food and Drug Administration. Visual reference guide on Hershberger assay procedure, including a dissection video: http://rndmoa.kfda.go.kr/ /endocrine/reference/education_fr.html

23. OCDE (2008). Background Review Document on the Rodent Hershberger Bioassay. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 90. ENV/JM/MONO(2008)17.

24. OCDE (2008). Draft Validation report of the Intact, Stimulated, Weanling Male Rat Version of the Hershberger Bioassay.

25. OCDE (2009). Guidance Document on the Weanling Hershberger Bioassay in rats: A shortterm screening assay for (anti)androgenic properties. Series on Testing and Assessment, Number 115.

▼**M5**

26. Diretiva 2010/63/UE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 22 de setembro de 2010, relativa à proteção dos animais utilizados para fins científicos (JO L 276 de 20.10.2010, p. 33).

27. Os seguintes capítulos do presente anexo:

B.1.bis: Toxicidade oral aguda — Procedimento de dose fixa.

B.1.tris: Toxicidade oral aguda — Método de classificação de toxicidade aguda

▼M5

B.56 ESTUDO ALARGADO DE TOXICIDADE DURANTE A REPRODUÇÃO NUMA GERAÇÃO

INTRODUÇÃO

1. Este método de ensaio é equivalente ao *Test Guideline* TG 443 (2012) da OCDE. Baseia-se na proposta do Comité Técnico para a Avaliação da Segurança dos Produtos Químicos Agrícolas (ACSA) do *International Life Science Institute* (ILSI) — *Health and Environmental Sciences Institute* (HESI), para um estudo alargado da reprodução numa geração, no estádio do ciclo de vida F_1, como o publicado por Cooper *et al*., 2006 (1). O protocolo seguido no estudo foi melhorado e esclarecido de modo a proporcionar flexibilidade e a salientar a importância de se partir dos conhecimentos existentes, utilizando observações em vida para orientar e adaptar os ensaios. Este método de ensaio fornece uma descrição detalhada da realização prática de um estudo alargado de toxicidade durante a reprodução numa geração. O método de ensaio descreve três coortes de animais da geração F_1:

Coorte 1: avalia os parâmetros(*endpoints*) de reprodução/desenvolvimento; esta coorte pode ser alargada para incluir uma geração F_2.

Coorte 2: avalia o potencial impacto da exposição a produtos químicos no desenvolvimento do sistema nervoso.

Coorte 3: avalia o potencial impacto da exposição a produtos químicos no desenvolvimento do sistema imunitário.

2. As decisões sobre a avaliação ou não da segunda geração e sobre a eventual omissão das coortes para estudo dos efeitos da neurotoxicidade e/ou da imunotoxicidade durante o desenvolvimento devem refletir o conhecimento existente quanto aos produtos químicos a avaliar, bem como as necessidades das diferentes autoridades reguladoras. O objetivo do método de ensaio é apresentar detalhes sobre a forma como o estudo poderá ser realizado e como cada coorte deverá ser avaliada.

3. O procedimento para decidir sobre o desencadeamento interno da produção de uma 2.ª geração encontra-se descrito no documento de orientações n.º 117 da OCDE (39), para as autoridades reguladoras que utilizem desencadeadores internos.

OBJETIVOS E CONSIDERAÇÕES INICIAIS

4. O principal objetivo do estudo alargado de toxicidade durante a reprodução numa geração é avaliar estádios específicos do ciclo de vida não cobertos por outros tipos de estudos de toxicidade e testar os efeitos que podem ocorrer em resultado da exposição pré- e pós-natal a produtos químicos. No que se refere aos parâmetros da reprodução, a expetativa é que, numa primeira fase e quando disponível, a informação proveniente de estudos de dosagem repetida [incluindo estudos de despistagem de toxicidade durante a reprodução — p. ex.: TG 422 da OCDE (32)] ou de ensaios de despistagem de desreguladores endócrinos a curto prazo [p. ex.: ensaio uterotrófico — método de ensaio B.54 (36), e ensaio de Hershberger — método de ensaio B.55 (37)] seja utilizada para detetar efeitos nos órgãos reprodutores de machos e fêmeas. Isso pode incluir a espermatogénese (histopatologia testicular) nos machos e os ciclos éstricos, as contagens de folículos/maturação dos ovócitos e integridade dos ovários (histopatologia) para as fêmeas. O estudo alargado de toxicidade durante a reprodução numa geração funcionará portanto como um ensaio de parâmetros da reprodução que requerem a interação de machos com fêmeas, fêmeas com conceptos e fêmeas com a descendência e com a geração F_1 até depois da maturidade sexual [consultar o documento de orientações n.º 151 da OCDE (40), que apoia o presente método de ensaio].

▼M5

5. O método de ensaio é concebido para permitir uma avaliação dos efeitos pré- e pós-natais de produtos químicos no desenvolvimento, bem como uma avaliação rigorosa da toxicidade sistémica em fêmeas grávidas e em lactação, assim como na descendência jovem e adulta. A análise detalhada dos principais parâmetros de desenvolvimento, como a viabilidade da descendência, a saúde neonatal, o estado de desenvolvimento à nascença e o desenvolvimento físico e funcional até à idade adulta, deverá permitir identificar os órgãos a analisar na descendência. Além disso, o estudo fornecerá e/ou confirmará informações sobre os efeitos de um determinado produto químico sobre a integridade e o funcionamento do sistema reprodutor dos machos e fêmeas adultos. São analisados, especificamente mas não exclusivamente, os seguintes parâmetros: função das gónadas, ciclo éstrico, maturação dos espermatozóides no epidídimo, comportamento de acasalamento, conceção, gravidez, parto e lactação. Além disso, a informação obtida nas avaliações da neurotoxicidade no desenvolvimento e imunotoxicidade no desenvolvimento permitirá caracterizar os potenciais efeitos nesses sistemas. Os dados derivados destes ensaios deverão permitir a determinação dos níveis sem efeitos adversos observáveis (NOAEL), dos níveis mínimos com efeitos adversos observáveis (LOAEL) e/ou das doses de referência para os vários parâmetros e/ou ser utilizados para caracterizar efeitos detetados em anteriores estudos de dose repetida e/ou funcionar como orientação para ensaios subsequentes.

6. Na figura 1 é apresentado um esquema do protocolo. O produto químico em estudo é administrado continuamente em doses graduadas a vários grupos de machos e fêmeas na maturidade sexual. Esta geração parental (P) recebe doses do produto durante um período definido pré-acasalamento (selecionado com base na informação disponível sobre o produto químico em estudo, mas com um mínimo de duas semanas) e durante um período de acasalamento de duas semanas. Os machos P continuam a receber tratamento pelo menos até ao desmame da descendência F_1. Devem ser tratados durante um mínimo de 10 semanas. Podem ser tratados durante mais tempo, se necessário para esclarecer certos efeitos sobre a reprodução. O tratamento das fêmeas P é continuado durante a gravidez e a amamentação, terminando após o desmame das respetivas ninhadas (ou seja, 8 a 10 semanas de tratamento). A descendência F_1 continua a ser tratada com o produto químico em estudo desde o desmame até à idade adulta. Se se pretender avaliar uma segunda geração [consultar o documento de orientações 117 da OCDE (39)], a descendência F_1 será mantida em tratamento até ao desmame da geração F_2, ou até à conclusão do estudo.

7. As observações clínicas e os exames patológicos são realizados em todos os animais para deteção de sinais de toxicidade, com especial ênfase sobre a integridade e o funcionamento dos sistemas reprodutores masculino e feminino e sobre a saúde, crescimento, desenvolvimento e funções da descendência. No momento do desmame, a descendência selecionada é atribuída a subgrupos específicos (coortes 1-3; ver os pontos 33 e 34 e a figura 1) para a continuação dos estudos, incluindo a maturação sexual, as funções e integridade dos órgãos reprodutores, os parãmetros neurológicos e comportamentais ou as funções imunitárias.

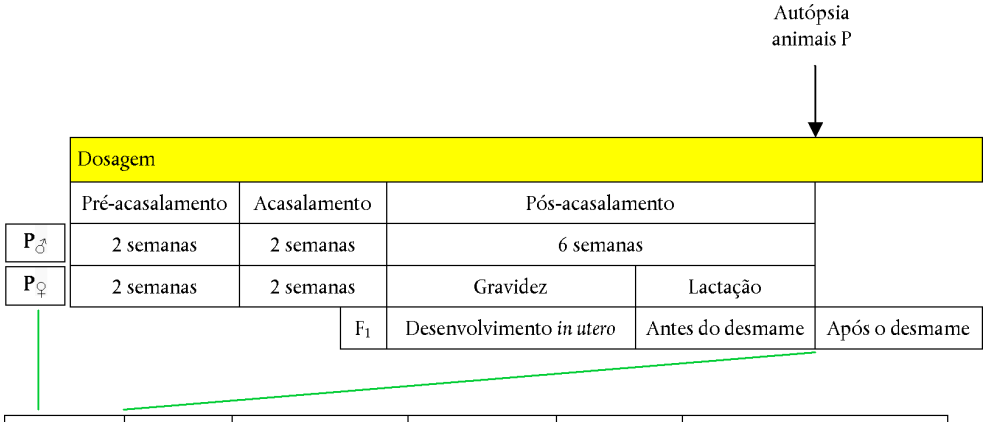
8. Na realização do estudo, deverão ser seguidos os princípios de orientação e as considerações descritas no documento de orientações 19 da OCDE quanto ao reconhecimento, avaliação e utilização dos sinais clínicos como parâmetros de tratamento humano para experiências com animais utilizados em avaliações de segurança (34).

▼M5

9. Quando estiver disponível um número suficiente de estudos para verificar o impacto deste novo protocolo, o método de ensaio será reanalisado e, se necessário, revisto à luz da experiência adquirida.

Figura 1

Esquema do «Estudo alargado de toxicidade durante a reprodução numa geração»



Geração parental	Coorte	Designação	Animais/coorte	Maturidade sexual	Idade aproximada aquando da autópsia (semanas)
Alvo: 20 ninhadas por grupo	1A	Reprodutiva	20 M + 20 F	Sim	13
	1B	Reprodutiva	20 M + 20 F	Sim	14 ou 20-25, se desencadeada
	2A	Neurotoxicidade	10 M + 10 F @	Sim	11-12
	2B	Neurotoxicidade	10 M + 10 F @	Não	3
	3	Immunotoxicidade	10 M + 10 F @	Sim	8
	Excedente	Não utilizados		Não	3

@ um por ninhada, representativo se possível, de 20 ninhadas no total

DESCRIÇÃO DO MÉTODO/PREPARAÇÃO PARA O ENSAIO

Animais

Seleção da estirpe e espécie animal

10. A escolha da espécie para o ensaio de toxicidade durante a reprodução deve ser cuidadosamente considerada à luz de todas as informações disponíveis. Contudo, tendo em conta a grande quantidade de dados contextuais e a comparabilidade com ensaios de toxicidade geral, o rato é normalmente a espécie preferida, pelo que os critérios e recomendações fornecidos neste método de ensaio se referem a esta espécie. Se for utilizada outra espécie, deve ser fornecida uma justificação e será necessário proceder às modificações adequadas ao protocolo. As estirpes com níveis baixos de fecundidade ou com elevada incidência bem conhecida de defeitos de desenvolvimento espontâneos não devem ser utilizadas.

Idade, peso corporal e critérios de inclusão

11. Devem ser utilizados animais progenitores saudáveis, que não tenham sido sujeitos a procedimentos experimentais anteriores. Os estudos deverão incluir machos e fêmeas, sendo que as fêmeas devem ser nulíparas e não devem estar grávidas. Os animais P devem ser animais maturos, de peso semelhante (considerando o respetivo sexo) no início da administração do produto químico, com uma idade semelhante (aproximadamente 90 dias) no momento do acasalamento e representativos da espécie e estirpe em estudo. Os animais devem ser aclimatizados durante pelo menos 5 dias após a chegada. Os animais são aleatoriamente distribuídos pelos grupos de controlo e tratamento, de tal forma que resulte em valores médios de peso corporal comparáveis entre os grupos (ou seja, ± 20 % da média).

▼M5

Condições de alojamento e alimentação

12. A temperatura na sala onde se encontram os animais do estudo deve ser de 22 °C (± 3 °C). A humidade relativa deve estar entre 30-70 %, com uma gama ideal de 50-60 %. A iluminação artificial deve seguir um regime de 12 horas com luz e 12 horas sem luz. Podem ser usadas dietas convencionais de laboratório, com acesso ilimitado a água potável. Deve ser dada especial atenção ao teor de fitoestrogénios na dieta, uma vez que um elevado nível de fitoestrogénios na dieta poderá afetar alguns dos parâmetros de reprodução. Recomendam-se dietas normalizadas de fórmula aberta com utilização reduzida de produtos químicos estrogénicos (2) (30). A escolha da dieta pode ser influenciada pela necessidade de garantir uma mistura adequada do produto químico em estudo, quando administrado por essa via. Devem verificar-se o teor, a homogeneidade e a estabilidade do produto químico em estudo na dieta. Os alimentos e a água potável devem ser analisados regularmente para detetar eventuais contaminantes. Devem ser mantidas amostras de cada lote da dieta utilizada durante o estudo, em condições adequadas (p. ex.: congeladas a –20 °C), até à finalização do relatório, para o caso de os resultados exigirem análises mais aprofundadas dos ingredientes da dieta.

13. Os animais devem ser colocados em gaiolas em pequenos grupos do mesmo sexo e grupo de tratamento. Podem ser alojados individualmente para evitar potenciais ferimentos (p. ex.: machos após o período de acasalamento). O acasalamento deve ocorrer em gaiolas adequadas. Constatada a copulação, as fêmeas que se presuma estarem grávidas devem ser alojadas em separado, em gaiolas de maternidade ou parto, onde lhes devem ser fornecidos materiais adequados e definidos para nidificação. As ninhadas devem ser alojadas com as respetivas progenitoras até ao desmame. Os animais F_1 devem ser alojados em pequenos grupos do mesmo sexo e grupo de tratamento, desde o desmame até à conclusão do estudo. Caso se justifique do ponto de vista científico, os animais podem ser alojados individualmente. O nível de fitoestrogénios presente no material para nidificação deve ser mínimo.

Número e identificação dos animais

14. Normalmente, cada grupo de ensaio e de controlo deve conter um número de pares de animais em fase de acasalamento suficiente para gerar, pelo menos, 20 fêmeas grávidas por grupo de dosagem. O objetivo é produzir gravidezes suficientes para assegurar uma avaliação significativa do potencial que o produto químico tem para afetar a fertilidade, a gravidez e o comportamento materno da geração P e o crescimento e desenvolvimento da descendência F_1, desde a conceção até à maturidade. O facto de não se obter o número desejado de fêmeas grávidas não invalida necessariamente o estudo, decisão que deverá ser tomada caso a caso, tendo em consideração uma potencial relação causal com o produto químico em estudo.

15. Cada animal P recebe um número de identificação único, antes do início da administração da dose prevsta do produto. Se existirem dados de histórico laboratorial que sugiram que uma percentagem significativa de fêmeas poderá não apresentar ciclos éstricos regulares (4 ou 5 dias), aconselha-se a realização de uma avaliação dos ciclos éstricos antes do início do tratamento. Em alternativa, a dimensão do grupo pode ser aumentada de modo a assegurar que pelo menos 20 fêmeas em cada grupo apresentem ciclos éstricos regulares (4 ou 5 dias) no início do tratamento. Todos os idivíduos da geração F_1 são identificados com um número único quando os neonatos são examinados pela primeira vez no dia 0 ou 1 após o nascimento (PND). Devem ser mantidos registos com indicação das ninhadas e da sua origem para todos os animais F_1, e F_2, quando aplicável, durante todo o estudo.

▼M5

Produto químico em estudo

Informações disponíveis sobre o produto químico em estudo

16. A análise das informações existentes é importante para as decisões sobre a via de administração, a escolha do veículo, a seleção da espécie animal, a seleção das dosagens e as potenciais modificações do esquema de dosagem. Assim, ao planear o «Estudo alargado de toxicidade durante a reprodução numa geração», devem ser tidas em consideração todas as informações disponíveis relevantes sobre o produto químico em estudo, ou seja, propriedades físico-químicas, toxicocinéticas (incluindo o metabolismo específico da espécie) e toxicodinâmicas, relações estrutura/atividade (SAR), processos metabólicos *in vitro*, resultados de estudos de toxicidade anteriores e informações relevantes sobre produtos com uma estrutura análoga. As informações preliminares sobre a absorção, distribuição, metabolismo e eliminação (ADME) e sobre a bioacumulação podem ser derivadas a partir da estrutura química, de dados físico-químicos, da importância das ligações às proteínas plasmáticas ou de estudos toxicocinéticos (TK), ao passo que os resultados de estudos de toxicidade poderão fornecer informações adicionais, por exemplo, sobre os NOAEL, o metabolismo ou a indução desse mesmo metabolismo.

Consideração de dados de toxicocinética

17. Embora não sejam necessários, os dados de toxicocinética de estudos anteriormente realizados para a determinação de intervalos de dosagem ou outros são extremamente úteis para o planeamento da conceção do estudo, escolha dos níveis de dosagem e interpretação de resultados. Têm especial utilidade os dados que: 1) confirmam a exposição dos fetos em desenvolvimento e das crias ao produto químico em estudo (ou aos metabolitos relevantes); 2) fornecem uma estimativa da dosimetria interna; e 3) avaliam a potencial saturação dependente da dosagem dos processos cinéticos. Os dados toxicocinéticos adicionais, tais como perfis de metabolitos, dados de concentração ao longo do tempo, etc., devem também ser considerados, se disponíveis. Podem ainda ser recolhidos dados toxicocinéticos suplementares durante o estudo principal, desde que tal não interfira com a recolha e interpretação dos parâmetros do estudo principal.

Como orientação geral, o seguinte conjunto de dados toxicocinéticos seria útil no planeamento do «Estudo alargado de toxicidade durante a reprodução numa geração»:

— Fase final da gravidez (p. ex.: 20.º dia de gestação) — sangue materno e sangue fetal;

— Fase intermédia de amamentação (10.º dia após o nascimento) — sangue materno, sangue da cria e/ou leite;

— Fase inicial do pós-desmame (p. ex.: 28.º dia após o nascimento) — amostras de sangue em fase de desmame.

Deve haver flexibilidade na determinação das substâncias específicas a analisar (p. ex.: produto químico principal e/ou metabolitos) e do regime de amostragem. Por exemplo, o número e o momento de colheita das amostras num determinado dia de amostragem dependerão da via de exposição e do conhecimento prévio das propriedades toxicocinéticas em animais não grávidos. Em estudos sobre a dieta, será suficiente uma amostra sempre à mesma hora em cada dia, ao passo que a administração por gavagem poderá exigir amostragens adicionais de modo a obter uma melhor estimativa do intervalo de dosagem interna. Contudo, não é necessário produzir um gráfico completo da dosagem ao longo do tempo para todos os dias em que são recolhidas amostras. Se necessário, o sangue pode ser agregado por sexo dentro de cada ninhada para as análises fetais e neonatais.

▼M5

Via de administração

18. A seleção da via deve ter em consideração a(s) vias(s) mais relevante(s) para a exposição humana. Embora o protocolo seja concebido para administração do produto químico em estudo através da dieta, pode ser modificado para administração por outras vias (água potável, gavagem, inalação, derme), dependendo das características do produto químico e das informações que se pretendem obter.

Escolha do veículo

19. Quando necessário, o produto químico em estudo pode ser dissolvido ou suspenso num veículo adequado. Recomenda-se que, quando possível, seja considerada primeiro a utilização de uma solução/suspensão aquosa, antes da possibilidade de uma solução/suspensão oleosa (p. ex., óleo de milho). No que se refere a outros veículos que não a água, devem ser conhecidas as características tóxicas do veículo. Deve ser evitada a utilização de veículos com potencial toxicidade intrínseca (p. ex., acetona, DMSO). A estabilidade do produto químico em estudo no veículo deve ser determinada. Se for utilizado um veículo ou outro aditivo para facilitar a dosagem, devem consideradar-se as seguintes características: efeitos na absorção, distribuição, metabolismo ou retenção do produto químico em estudo; efeitos sobre as propriedades químicas do produto químico em estudo que possam alterar as respetivas características de toxicidade; e efeitos sobre o consumo de alimentos ou água ou o estado nutricional dos animais.

Seleção da dose

20. Normalmente, o estudo deve incluir, pelo menos, três níveis de dosagem e um controlo simultâneo. Ao selecionar os níveis de dosagem adequados, o investigador deve considerar todas as informações disponíveis, incluindo as informações de dosagem de estudos anteriores, dados toxicocinéticos em animais grávidos ou não grávidos, importância da transferência na amamentação e estimativas da exposição humana. Se estiverem disponíveis dados de toxicocinética que indiquem uma saturação dos processos toxicocinéticos dependente da dosagem, deve ter-se o cuidado de evitar dosagens elevadas que resultem claramente em saturação, desde que, como é evidente, se preveja que a exposição dos seres humanos seja muito inferior ao ponto de saturação. Nesses casos, a dosagem mais elevada deverá ser igual ou ligeiramente superior ao ponto de inflexão na transição para um comportamento toxicocinético não-linear.

21. Na ausência de dados toxicocinéticos relevantes, as dosagens devem basear-se nos efeitos tóxicos, salvo quando existam limitações devidas à natureza físico-química do produto químico em estudo. Se os níveis de dosagem se basearem na toxicidade, a dose mais elevada deve ser escolhida com o objetivo de induzir alguma toxicidade sistémica, mas não a morte ou grande sofrimento dos animais.

22. Deve ser selecionada uma sequência descendente de níveis de dosagem para demonstrar qualquer efeito relacionado com a dose e para estabelecer os NOAEL ou dosagens próximas do limite de deteção que permitam deduzir uma dose de referência para o(s) parâmetro(s) mais sensíveis. Para evitar um grande espaçamento de doses entre os NOAEL e os LOAEL, o ideal será normalmente utilizar intervalos com uma ordem de grandeza do dobro ou do quádruplo. Em geral, será preferível acrescentar um quarto grupo de ensaio do que utilizar intervalos demasiado grandes (p. ex.: com um fator de multiplicação superior a 10) entre as doses.

23. Exceto no que se refere ao tratamento com o produto químico em estudo, os animais no grupo de controlo são tratados de forma idêntica aos indivíduos no grupo de ensaio. O grupo de controlo não deverá receber tratamento, deverá receber um tratamento similado ou constituirá um grupo de controlo do veículo em caso de utilização de um veículo para administração do produto químico em estudo. Se for utilizado um veículo, o grupo de controlo deve receber o volume mais elevado desse veículo utilizado no estudo.

▼M5

Ensaio de limite

24. Caso não haja evidência de toxicidade com uma dose de pelo menos 1 000 mg/kg de peso corporal/dia em estudos de dose repetida, ou se não for esperada toxicidade com base nos dados de produtos químicos estrutural e/ou metabolicamente relacionados, indicando similaridade nas propriedades metabólicas *in vivo/in vitro*, poderá não ser necessário realizar um estudo com várias dosagens. Nesses casos, o «Estudo alargado de toxicidade durante a reprodução numa geração» pode ser realizado utilizando um grupo de controlo e uma dose única pelo menos igual a 1 000 mg/kg de peso corporal/dia. Contudo, caso sejam detetadas evidências de toxicidade durante a reprodução ou no desenvolvimento com este limite de dosagem, serão necessários mais estudos com dosagens inferiores para identificação de um NOAEL. Estas considerações sobre os ensaios de limite aplicam-se apenas quando a exposição humana não indicar a necessidade de ensaiar uma dosagem superior.

PROCEDIMENTOS

Exposição da descendência

25. A exposição na dieta é o método de administração preferencial. Se forem realizados estudos com gavagem, importa notar que normalmente as crias apenas receberão o produto químico em estudo de forma indireta, através do leite, até ao início da respetiva administração direta, a partir do desmame. Em estudos com administração na dieta ou na água potável, as crias receberão adicionalmente o produto químico em estudo de forma direta quando começarem a alimentar-se por si próprias, durante a última semana do período de amamentação. Devem ser consideradas modificações à conceção do estudo nos casos em que a excreção do produto químico em estudo no leite for fraca e em que haja falta de evidência para uma exposição contínua da descendência. Nestes casos, a dosagem direta às crias durante o período de amamentação deve ser considerada com base nas informações de toxicocinética disponíveis, toxicidade na descendência ou alterações em biomarcadores (3) (4). Os benefícios e as desvantagens d evem ser cuidadosamente considerados antes da realização de estudos de dosagem direta em crias em aleitamento (5).

Esquema de dosagem e administração das doses

26. Poderão existir informações disponíveis sobre ciclos éstricos, histopatologia do aparelho reprodutor masculino e feminino e análise de esperma nos testículos/epidídimo de estudos anteriores de toxicidade de dose repetida com duração adequada. A duração do tratamento pré-acasalamento no «Estudo alargado de toxicidade durante a reprodução numa geração» visa, portanto, detetar os efeitos de alterações funcionais que possam interferir com o comportamento de acasalamento e fertilização. O tratamento pré-acasalamento deve ser suficientemente longo para atingir condições de exposição em estado de equilíbrio nos machos e fêmeas da geração P. Um tratamento pré-acasalamento de 2 semanas para ambos os sexos é considerado adequado na maioria dos casos. Para as fêmeas, esse período abrange 3-4 ciclos éstricos completos e deve ser suficiente para detetar quaisquer efeitos adversos nesses ciclos. Para os machos, equivale ao tempo necessário para o trânsito dos espermatozóides em maturação pelo epidídimo e deverá permitir detetar efeitos pós-testiculares no esperma (durante as fases finais da espermiação e maturação dos espermatozóides no epidídimo) no acasalamento. No momento terminal, para o qual estejam programados os parâmetros de análise do esperma e de histopatologia dos testículos e epidídimo, os machos P e F_1 terão estado expostos durante pelo menos um ciclo espermatogénico completo [(6) (7) (8) (9) e documento de orientações 151 da OCDE (40)].

▼M5

27. Os cenários de exposição pré-acasalamento para os machos podem ser adaptados se estudos anteriores tiverem identificado claramente toxicidade testicular (espermatogénese negativamente afetada) ou efeitos na integridade e função do esperma. Da mesma forma, para as fêmeas, os efeitos conhecidos do produto químico em estudo sobre o ciclo éstrico e, por conseguinte, sobre a recetividade sexual, poderão justificar diferentes cenários de exposição pré-acasalamento. Em casos especiais, poderá ser aceitável que o tratamento das fêmeas P seja iniciado apenas após a obtenção de um esfregaço com presença de esperma [ver documento de orientações 151 da OCDE (40)].

28. Quando o período de dosagem pré-acasalamento estiver estabelecido, os animais devem ser tratados continuamente com o produto químico em estudo 7 dias/semana até à autópsia. Todos os animais devem receber a dosagem pelo mesmo método. A dosagem deve prosseguir durante o período de acasalamento de 2 semanas e, no caso das fêmeas P, ao longo da gestação e da amamentação até ao dia do término após o desmame. Os machos devem ser tratados da mesma forma até ao término, no momento em que os animais F_1 são desmamados. Para a autópsia, deve ser dada prioridade às fêmeas, que devem ser autopsiadas no próprio dia ou próximo do dia da lactação. A autópsia dos machos pode ser distribuída por vários dias, em função das instalações laboratoriais. Salvo nos casos em que já tenha sido iniciada durante o período de amamentação, a dosagem direta dos machos e fêmeas F_1 selecionados deve ser iniciada aquando do desmame e continuar até à autópsia programada, dependendo da distribuição pelas coortes.

29. No caso de produtos químicos administrados através da dieta ou da água potável, é importante assegurar que as quantidades do produto químico em estudo envolvidas não interferem com a nutrição normal ou com a composição da água. Quando o produto químico em estudo é administrado na dieta, pode aplicar-se uma concentração constante (ppm) ou um nível constante de dosagem em termos do peso corporal do animal; a opção escolhida deve ser especificada.

30. Quando o produto químico em estudo é administrado por gavagem, o volume de líquido administrado de uma só vez não deverá normalmente exceder 1 ml/100 g de peso corporal (0,4 ml/100 g de peso corporal é o máximo no caso de utilização de óleos, por exemplo óleo de milho). Exceto no caso de produtos químicos irritantes ou corrosivos, que normalmente revelam efeitos exacerbados em concentrações superiores, a variabilidade no volume de ensaio deve ser minimizada ajustando a concentração de modo a garantir um volume constante em todos os níveis de dosagem. O tratamento deve ser fornecido aproximadamente à mesma hora em cada dia. Normalmente, a dose para cada animal deve basear-se na determinação mais recente do peso corporal de cada indivíduo e decverá ser ajustada pelo menos uma vez por semana nos machos adultos e nas fêmeas adultas não grávidas, e a cada dois dias para as fêmeas grávidas e os animais F_1, quando a administração for efetuada antes do desmame e durante as 2 semanas após o desmame. Se os dados de toxicocinética indicarem uma baixa transferência placentária do produto químico em estudo, poderá ser necessário ajustar a dose de gavagem durante a última semana da gravidez, de modo a evitar a administração de uma dose excessivamente tóxica à progenitora. As fêmeas não devem ser tratadas por gavagem ou por qualquer outra via de tratamento em que o animal tenha de ser manuseado, no dia do parto; a omissão da administração do produto químico em estudo nesse dia é preferível à perturbação do processo de parto.

▼M5

Acasalamento

31. Cada fêmea P deve ser colocada com um único macho não aparentado e escolhido aleatoriamente do mesmo grupo de dosagem (emparelhamento 1:1) até que seja observada evidência de copulação ou que tenham passado 2 semanas. Se não houver machos suficientes, por exemplo devido a morte de machos antes do emparelhamento, o(s) macho(s) que já tenha(m) acasalado pode(m) ser emparelhado(s) (1:1) com outra(s) fêmea(s), de modo a que todas as fêmeas sejam emparelhadas. O dia 0 da gravidez é definido como o dia em que é confirmada a evidência de acasalamento (deteção de rolhão vaginal ou esperma). Os animais devem ser separados logo que possível após observação da evidência de copulação. Se não tiver ocorrido acasalamento após 2 semanas, os animais devem ser separados sem que haja mais oportunidade de acasalamento. Os pares acasalados devem ser claramente identificados nos dados.

Dimensão da ninhada

32. No 4.º dia após o nascimento, a dimensão de cada ninhada pode ser ajustada eliminando as crias em excesso por seleção aleatória, de modo a obter o valor mais próximo possível de cinco machos e cinco fêmeas por ninhada. A eliminação seletiva de crias, por exemplo com base no peso corporal, não será adequada. Sempre que o número de crias macho ou fêmea não permitir a existência de cinco de cada sexo por ninhada, poderá proceder-se a um ajuste parcial (p. ex.: seis machos e quatro fêmeas).

Seleção de crias para estudos pós-desmame (ver Figura 1)

33. Aquando do desmame (cerca do 21.º dia após o nascimento), são selecionadas para exames posteriores crias de todas as ninhadas disponíveis, até 20 por grupo de controlo e dose, que serão mantidas até à maturação sexual (a não ser que sejam necessários ensaios mais precoces). As crias são selecionadas aleatoriamente, com a exceção de que não devem ser incluídos animais de tamanho claramente inferior ao normal (animais com peso corporal mais de dois desvios padrão abaixo do peso corporal médio das crias da respetiva ninhada), na medida em que não serão provavelmente representativos do grupo de tratamento.

No 21.º dia após o nascimento, as crias F_1 selecionadas são atribuídas aleatoriamente a uma das três coortes de animais, da seguinte forma:

Coorte 1 (1A e 1B) = Ensaio de toxicidade durante a reprodução/no desenvolvimento

Coorte 2 (2A e 2B) = Ensaio de neurotoxicidade no desenvolvimento

Coorte 3 = Ensaio de imunotoxicidade no desenvolvimento

Coorte 1A: Um macho e uma fêmea/ninhada/grupo (20/sexo/grupo): seleção prioritária para avaliação primária dos efeitos sobre os sistemas reprodutivos e da toxicidade geral.

Coorte 1B: Um macho e uma fêmea/ninhada/grupo (20/sexo/grupo): seleção prioritária para avaliação e seguimento do comportamento reprodutivo através do acasalamento de animais F_1, quando avaliados [consultar o documento de orientações 117 da OCDE (39)] e para obtenção de dados adicionais de histopatologia em casos de suspeita de tóxicos para o sistema reprodutivo ou endócrino, ou quando os resultados da coorte 1A não forem inequívocos.

Coorte 2A: Total de 20 crias por grupo (10 machos e 10 fêmeas por grupo; um macho ou uma fêmea por ninhada) destinadas a ensaios neurocomportamentais, seguidos de avaliação neuro-histopatológica quando chegados à fase adulta.

Coorte 2B: Total de 20 crias por grupo (10 machos e 10 fêmeas por grupo; um macho ou uma fêmea por ninhada) destinadas a avaliação neuro-histopatológica no desmame (21.º ou 22.º dia após o nascimento). Se o número de animais for insuficiente, deve dar-se preferência à colocação dos animais na Coorte 2A.

▼M5

Coorte 3: Total de 20 crias por grupo (10 machos e 10 fêmeas por grupo; um por ninhada, quando possível). Poderá ser necessário utilizar mais crias do grupo de controlo como animais de controlo positivo no ensaio de resposta de anticorpos dependentes de células T (TDAR) no 56.º ± 3 dia após o nascimento.

34. Caso não exista um número insuficiente de crias numa ninhada para atribuição a todas as coortes, a coorte 1 tem precedência, já que poderá ser conservada para produzir uma geração F_2. Podem ser atribuídas mais crias a qualquer uma das coortes em caso de preocupações específicas; por exemplo, se houver suspeita de que um produto químico é para o sistema nervoso, imunitário ou reprodutivo. Estas crias podem ser utilizadas para exames em diferentes momentos ou para a avaliação de parâmetros suplementares. As crias não afetadas a uma dterminada coorte serão analisadas na ótica da bioquímica clínica (parágrafo 55) e sujeitas a uma autópsia macroscópica (parágrafo 68).

Segundo acasalamento dos animais P

35. Normalmente, não se recomenda um segundo acasalamento dos animais P, já que isso poderá implicar a perda de informações importantes sobre o número de locais de implantação (e, portanto, de dados sobre as perdas pós-implantação e perinatais, indicadoras de um possível potencial teratogénico) na primeira ninhada. A necessidade de verificar ou elucidar um determinado efeito em fêmeas expostas terá uma melhor resposta alargando o estudo de modo a incluir um acasalamento da geração F_1. Contudo, um segundo acasalamento dos machos P com fêmeas não tratadas será sempre uma opção para esclarecer os resultados que não sejam inequívocos ou para uma caracterização mais aprofundada dos efeitos sobre a fertilidade observados no primeiro acasalamento.

OBSERVAÇÕES EM VIDA

Observações clínicas

36. Para os animais P e os animais F_1 selecionados, é realizada uma observação clínica geral uma vez por dia. Em caso de administração por gavagem, as observações clínicas deverão ter lugar antes e depois da administração (para possíveis sinais de toxicidade associada ao pico de concentração plasmática). Registam-se as alterações comportamentais pertinentes, os sinais de parto difícil ou prolongado e todos os sinais de toxicidade. Duas vezes por dia (durante o fim de semana, uma vez por dia), todos os animais devrão ser observados em termos de toxicidade grave, morbilidade e mortalidade.

37. Além disso, deverá realizar-se semanalmente um exame mais detalhado de todos os animais P e F_1 (após o desmame), que para maior conveniência poderá realizar-se numa ocasião em que o animal seja pesado, o que minimiza o *stress* do manuseamento. As observações deverão ser cuidadosamente realizadas e registadas utilizando sistemas de classificação definidos pelo laboratório de ensaio. Devem ser envidados esforços para garantir um mínimo de variação nas condições de ensaio. Os sinais a ter em conta devem incluir, sem caráter limitativo, alterações na pele, pêlo, olhos, membranas mucosas, ocorrência de secreções e excreções e as atividades autónomas (p. ex., lacrimação, piloereção, tamanho das pupilas, padrão respiratório anómalo). Devem também ser registadas as alterações na marcha, postura, resposta ao manuseamento, bem como a presença de movimentos clónicos ou tónicos, estereotipia (p. ex., excesso de limpeza, movimentos repetitivos em círculo) ou comportamentos estranhos (p. ex., automutilação, marcha para a retaguarda).

▼M5

Peso corporal e consumo de alimentos/água

38. Os animais P são pesados no primeiro dia da dosagem e, depois disso, pelo menos uma vez por semana. Adicionalmente, as fêmeas P são pesadas durante a amamentação nos mesmos dias da pesagem das crias das respetivas ninhadas (ver parágrafo 44). Todos os animais F_1 são pesados individualmente no desmame (21.º dia após o nascimento) e, depois disso, pelo menos uma vez por semana. O peso corporal deverá também ser registado no dia em que atingem a puberdade (conclusão da separação prepucial ou abertura da vagina). Todos os animais são pesados aquando do sacrifício.

39. Durante o estudo, o consumo de alimentos e água (caso a administração do produto químico em estudo seja feita na água potável) é registado pelo menos uma vez por semana, nos mesmos dias das pesagens dos animais (exceto durante a coabitação). O consumo de alimentos de cada gaiola de animais F_1 é registado semanalmente, a partir da colocação numa determinada coorte.

Ciclos éstricos

40. Poderão já estar disponíveis informações preliminares sobre os efeitos relacionados com o produto químico em estudo no ciclo éstrico, obtidas em anteriores estudos de toxicidade de dose repetida, que podem ser utilizadas na conceção de um protocolo de ensaio específico para o «Estudo alargado de toxicidade durante a reprodução numa geração» do produto químico em estudo. Normalmente, a avaliação do ciclo éstrico (por citologia vaginal) começará no início do período de tratamento e continuará até confirmação do acasalamento ou até ao final do período de acasalamento de 2 semanas. Se as fêmeas tiverem sido sujeitas a despistagem para determinar se o seu ciclo éstrico é normal antes do tratamento, será útil continuar a obter esfregaços após o início do tratamento, mas se existirem preocupações quanto a efeitos não específicos no início do tratamento (nomeadamente uma redução inicial marcada no consumo de alimentos), pode permitir-se que os animais se adaptem ao tratamento durante um período máximo de duas semanas antes de iniciar o período de recolha de esfregaços nas 2 semanas anteriores ao emparelhamento. Se o período de tratamento da fêmea for alargado desta forma (ou seja, com um tratamento pré-acasalamento de 4 semanas), deve considerar-se a aquisição de animais mais jovens e o alargamento do período de tratamento dos machos antes do emparelhamento. Ao obter células vaginais/cervicais, deve ter-se o cuidado de evitar perturbações na mucosa e, por consequência, a indução de pseudogravidezes (10) (11).

41. Os esfregaços vaginais devem ser examinados diariamente para todas as fêmeas F_1 da coorte 1A, desde o início da abertura da vagina até que se registe o primeiro esfregaço cornificado, de modo a determinar o período entre os dois eventos. Os ciclos éstricos de todas as fêmeas F_1 na coorte 1A devem também ser acompanhados durante um período de duas semanas, iniciado por volta do 75.º dia após o nascimento. Além disso, caso seja necessário o acasalamento da geração F_1, a citologia vaginal na coorte 1B será seguida desde o momento do emparelhamento até que seja detetada evidência de acasalamento.

Acasalamento e gravidez

42. Além dos parâmetros padrão (p. ex., peso corporal, consumo de alimentos, observações clínicas, incluindo verificações da mortalidade/morbilidade), são registadas as datas de emparelhamento, a data de inseminação e a data de parto, e calculados o intervalo pré-coital (do emparelhamento até à inseminação) e a duração da gravidez (da inseminação até ao parto). As fêmeas P devem ser examinadas cuidadosamente para sinais de distócia na altura prevista para o parto. Quaisquer anomalias no comportamento de nidificação ou no aleitamento devem ser registadas.

▼M5

43. O dia do parto é o dia 0 de amamentação (LD 0) para a progenitora e o dia 0 após o nascimento (PND 0) para a descendência. Em alternativa, todas as comparações poderão também basear-se no tempo pós-coital, para evitar que os dados do desenvolvimento pós-natal sejam afetados por diferenças na duração da gravidez; contudo, deve também ser registado o período decorrido desde o parto. Isso será especialmente importante quando o produto químico em estudo tem influência sobre a duração da gravidez.

Parâmetros de descendência

44. Cada ninhada deve ser examinada o mais cedo possível após o nascimento (dia 0 ou 1 após o nascimento) de modo a estabelecer o número e o sexo das crias, de nados-mortos, de nados-vivos e a presença de anomalias graves (anomalias visíveis externamente, incluindo fenda palatina, hemorragias subcutâneas, textura ou cor anómala da pele, presença de cordão umbilical, ausência de leite no estômago, presença de secreções secas). Além disso, o primeiro exame clínico dos neonatos deve incluir uma avaliação qualitativa da temperatura corporal, do estado de atividade e da reação ao manuseamento. As crias que sejam encontradas mortas no dia 0 após o nascimento ou mais tarde devem ser examinadas quanto a possíveis deficiências e às causas de morte. As crias vivas devem ser contadas e pesadas individualmente no dia 0 ou 1 após o nascimento e, depois disso, regularmente, pelo menos no 4.º, 7.º, 14.º e 21.º dia após o nascimento. Os exames clínicos aplicáveis à idade dos animais devem ser repetidos quando a descendência for pesada ou com maior frequência caso tenham sido feitas constatações específicas à nascença. Os sinais a ter em conta incluem, sem caráter limitativo: anomalias externas, alterações na pele, pelo, olhos, membranas mucosas, ocorrência de secreções e excreções e atividade autónoma. Também devem ser registadas as alterações na marcha, postura, resposta ao manuseamento, bem como a presença de movimentos clónicos ou tónicos, estereotipia ou comportamento estranho.

45. A distância anogenital (AGD) de cada cria deve ser medida pelo menos uma vez entre o dia 0 após o nascimento e o dia 4 após o nascimento. O peso corporal da cria deve ser recolhido no dia em que a AGD for medida e as AGD devem ser normalizadas de acordo com uma medida do tamanho da cria, preferencialmente a raiz cúbica do peso corporal (12). A presença de mamilos/auréolas nas crias macho deve ser verificada no 12.º ou 13.º dia após o nascimento.

46. Todos os animais F_1 selecionados são avaliados diariamente quanto à separação balanoprepucial ou abertura da vagina nos machos e fêmeas, respetivamente, com início antes do dia previsto para o surgimento desses sinais, de modo a detetar se a maturação sexual ocorre prematuramente. Devem ter-se em atenção quaisquer anomalias dos órgãos genitais, tais como filamentos vaginais persistentes, hipospadia ou epispádia do pénis. A maturidade sexual dos animais F_1 é comparada com o desenvolvimento físico através da determinação da idade e do peso corporal aquando da separação balanoprepucial ou da abertura da vagina nos machos e fêmeas, respetivamente (13).

Avaliação da potencial neurotoxicidade no desenvolvimento (coortes 2A e 2B)

47. Os animais da coorte 2A (10 machos e 10 fêmeas) e da coorte 2B (10 machos e 10 fêmeas) de cada grupo de tratamento (para cada coorte: 1 macho ou 1 fêmea por ninhada; todas as ninhadas representadas por pelo menos 1 cria; seleção aleatória) devem ser utilizados para avaliações de neurotoxicidade. Os animais da coorte 2A devem ser sujeitos a avaliações da resposta auditiva, de um conjunto de observações funcionais, da atividade motora (ver parágrafos 48-50) e da neuropatologia (ver parágrafos 74--75). Devem ser envidados esforços para garantir que as variações em todas

▼M5

as condições de ensaio sejam mínimas e não estejam sistematicamente relacionadas com o tratamento. Entre as variáveis que podem afetar o comportamento encontram-se o nível sonoro (p. ex., ruído intermitente), a temperatura, a humidade, a iluminação, os odores, a hora do dia e os fatores ambientais. Os resultados dos ensaios de neurotoxicidade devem ser interpretados em relação a valores de referência histórica de controlo adequados. Os animais da coorte 2B devem ser utilizados para avaliação neuropatológica no 21.º ou 22.º dia após o nascimento (ver parágrafos 74-75).

48. Deve ser realizado um ensaio de resposta auditiva no 24.º dia após o nascimento (± 1 dia) utilizando animais da coorte 2A. O dia do ensaio deve ser distribuído de forma equilibrada no interior dos grupos tratados e de controlo. Cada sessão é constituída por 50 ensaios. Na realização do ensaio de resposta auditiva, deve ser determinada a amplitude média de resposta em cada bloco de 10 ensaios (5 blocos de 10 ensaios), com condições de ensaio otimizadas para produzir habituação entre sessões. Estes procedimentos devem estar em conformidade com o método de ensaio B.53 (35).

49. Num momento adequeado, entre o 63.º e o 75.º dia após o nascimento, os animais da coorte 2A são sujeitos a um conjunto de observações funcionais e a um ensaio automatizado da atividade motora. Estes procedimentos devem ser conformes com os métodos de ensaio B.43 (33) e B.53 (35). O conjunto de observações funcionais inclui uma descrição aprofundada do aspeto, comportamento e integridade funcional do indivíduo. Esses elementos são avaliados através de observações na gaiola onde o animal é conservado, após remoção para uma área padrão de observação (campo aberto) em que o animal se move livremente e através de ensaios com manipulação. Devem ser examinados primeiro os animais menos interativos, acabando nos mais interativos. No apêndice 1 é apresentada uma lista das medições. Todos os animais devem ser observados cuidadosamente, por observadores formados que desconheçam o seu estado de tratamento e utilizando procedimentos normalizados, para minimizar a variabilidade devida ao observador. Quando possível, aconselha-se que seja sempre o mesmo observador a avaliar os animais num determinado ensaio. Se isso não for possível, é necessário demonstrar a fiabilidade entre observadores. Para cada parâmetro do conjunto de ensaios comportamentais, devem ser utilizadas escalas e critérios de classificação explícitos e definidos em termos operacionais. Se possível, devem ser desenvolvidas medidas quantitativas objetivas para os parâmetros observáveis que envolvem uma classificação subjetiva. No que se refere à atividade motora, cada animal é sujeito ao ensaio individualmente. A sessão de ensaio deve ser suficientemente longa para revelar a habituação entre sessões para efeitos de controlo. A atividade motora deve ser monitorizada por um aparelho automático de registo de atividade, capaz de detetar tanto aumentos como diminuições na atividade (ou seja, a atividade basal conforme medida pelo dispositivo não deve ser tão baixa a ponto de impedir a deteção de diminuições, nem tão elevada a ponto de impedir a deteção de aumentos na atividade). Cada dispositivo deve ser testado através de procedimentos padrão para assegurar, tanto quanto possível, a fiabilidade do funcionamento entre dispositivos e nos vários dias. Sempre que possível, os grupos de tratamento devem ser distribuídos de forma equilibrada pelos diferentes dispositivos. Os grupos de tratamento devem ser ensaiados de acordo com uma distribuição equilibrada ao longo do dia, de modo a evitar influências devidas aos ritmos circadianos de atividade.

50. Se as informações existentes indicarem a necessidade de outros ensaios funcionais (p. ex., sensoriais, sociais ou cognitivos), estes devem ser integrados sem comprometer a integridade das outras avaliações realizadas no estudo. Se este ensaio for realizado nos mesmos animais utilizados para os ensaios de resposta auditiva padrão, do conjunto de observações funcionais e da atividade motora, os diferentes ensaios devem ser programados de modo a minimizar o risco de comprometer a sua integridade. Estes procedimentos suplementares poderão ser particularmente úteis quando a observação empírica, os efeitos previstos ou os dados mecanísticos/modo de ação indicarem um tipo específico de neurotoxicidade.

▼M5

Avaliação de potencial imunotoxicidade no desenvolvimento (coorte 3)

51. No 56.º dia após o nascimento (± 3 dias), 10 machos e 10 fêmeas dos animais da coorte 3 de cada grupo de tratamento (1 macho ou 1 fêmea por ninhada; todas as ninhadas representadas por, pelo menos, 1 cria; seleção aleatória) devem ser usados num ensaio da resposta dos anticorpos dependente das células T, ou seja, da primeira resposta dos anticorpos IgM a um antigénio dependente de células T, como o ensaio com glóbulos vermelhos de ovelha (SRBC) ou o ensaio com hemocianina de lapa californiana (KLH), em conformidade com os atuais procedimentos de ensaio da imunotoxicidade (14) (15). A resposta pode ser avaliada através da contagem de células formadoras de placa (PFC) no baço ou da determinação do título de anticorpos IgM específicos para SRBC ou KLH no soro ELISA, no pico da resposta. O pico da resposta ocorre normalmente 4 (resposta PFC) ou 5 (ELISA) dias após a imunização intravenosa. Se a primeira resposta dos anticorpos for analisada através da contagem de células formadoras de placa, poderão avaliar-se subgrupos de animais em dias separados, desde que: a imunização e sacrifício do subgrupo sejam planeados de modo a que as PFC sejam contadas no pico da resposta; esses subgrupos contenham um número igual de descendentes do género masculino e feminino de todos os grupos de dose, incluindo os grupos de controlo; e esses subgrupos sejam avaliados aproximadamente com a mesma idade após o nascimento.A exposição ao produto químico em estudo continuará até ao dia anterior à colheita dos baços para o ensaio PFC ou de soro para o ensaio ELISA.

Avaliação de acompanhamento de potencial toxicidade durante a reprodução (coorte 1B)

52. Os animais da coorte 1B podem ser mantidos em tratamento para além do 90.º dia após o nascimento e, se necessário, procriados para obter uma geração F_2. Os machos e as fêmeas do mesmo grupo de admnistração devem coabitar (evitando o acasalamento entre irmãos) durante duas semanas, com início no 90.º dia após o nascimento ou após esse dia, mas não ultrapassando o 120.º dia após o nascimento. Os procedimentos devem ser os mesmos que para os animais P. No entanto, com base na suficiência de prova, poderá ser suficiente terminar as ninhadas no 4.º dia após o nascimento em vez de continuar a acompanhá-las até ao desmame ou para além disso.

OBSERVAÇÕES FINAIS

Bioquímica clínica/Hematologia

53. Os efeitos sistémicos devem ser monitorizados nos animais P. No término do estudo, são colhidas amostras de sangue em jejum de um local definido de dez machos e fêmeas P de cada grupo de dosagem, selecionados aleatoriamente. Essas amostras são armazenadas em condições adequadas e sujeitas a hematologia parcial ou exaustiva, bioquímica clínica, ensaio de T4 e TSH ou outros exames sugeridos pelo perfil de efeitos conhecido do produto químico em estudo [ver documento de orientações 151 da OCDE (40)]. Devem ser examinados os seguintes parâmetros hematológicos: hematócrito, concentração de hemoglobina, contagem de eritrócitos, contagem total e diferencial de leucócitos, contagem de plaquetas e tempo/potencial de coagulação sanguínea. Os exames ao plasma ou soro devem incluir: glicose, colesterol total, ureia, creatinina, proteína total, albumina e pelo menos duas enzimas indicativas dos efeitos hepatocelulares (tais como alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, fosfatase alcalina, gamaglutamiltranspeptidase e sorbitol desidrogenase). Em algumas circunstâncias, a medição de enzimas adicionais e ácidos biliares pode providenciar informações úteis. Para além disso, deve proceder-se à colheita e armazenamento de sangue de todos os animais para possíveis análises posteriores, de forma a ajudar a clarificar efeitos ambíguos ou a gerar dados internos de exposição. Se não se pretender um segundo acasalamento dos animais P, as amostras

▼M5

de sangue devem ser obtidas imediatamente antes do sacrifício programado ou durante esse procedimento. Se os animais envolvidos no estudo forem conservados, as amostras de sangue devem ser colhidas alguns dias antes de os animais acasalarem pela segunda vez. A não ser que os dados existentes dos estudos com dose repetida indiquem que o parâmetro não é afetado pelo produto químico em estudo, a análise à urina deve ser realizada antes do término e os seguintes parâmetros avaliados: aspeto, volume, osmolalidade ou gravidade específica, pH, proteína, glicose, sangue e células sanguíneas, vestígios celulares. Também se pode proceder à colheita de urina para monitorizar a excreção do produto químico em estudo e/ou do(s) seu(s) metabolito(s).

54. Os efeitos sistémicos também devem ser monitorizados nos animais F_1. No término do estudo, são colhidas amostras de sangue em jejum de um local definido de dez machos e fêmeas da coorte 1A de cada grupo de dosagem, selecionados aleatoriamente. As amostras são armazenadas em condições adequadas e sujeitas a bioquímica clínica padrão, incluindo a avaliação de níveis séricos para hormonas da tiróide (T4 e TSH), hematologia (contagem total e diferencial de leucócitos e eritrócitos) e avaliações da análise à urina.

55. As crias excedentes no 4.º dia após o nascimento devem ser sujeitas a uma autópsia macroscópica e deve considerar-se a medição das concentrações séricas das hormonas tiroideias (T4). Se necessário, pode proceder-se à colheita de sangue neonatal (4.º dia após o nascimento) por ninhadas para análises bioquímicas/da tiróide. Também é colhido sangue para análises T4 e TSH de animais desmamados sujeitos a autópsia macroscópica no 22.º dia após o nascimento (crias F_1 não selecionadas para coortes).

Parâmetros do esperma

56. Os parâmetros do esperma devem ser medidos em todos os machos da geração P, a não ser que existam dados que demonstrem que os parâmetros do esperma não são afetados num estudo de 90 dias. O exame dos parâmetros do esperma deve ser realizado em todos os machos da coorte 1A.

57. No término do estudo, é registado o peso dos testículos e do epidídimo de todos os machos P e F_1 (coorte 1A). Pelo menos um testículo e um epidídimo são reservados para exame histopatológico. O outro epidídimo é utilizado para a contagem das reservas de esperma na cauda do epidídimo (16) (17). Além disso, é colhido esperma da cauda do epidídimo (ou ducto deferente) utilizando métodos que minimizem os danos na avaliação da mobilidade e morfologia dos espermatozóides (18).

58. A mobilidade dos espermatozóides pode ser avaliada imediatamente após o sacrifício ou registada para análise posterior. A percentagem de espermatozóides com mobilidade progressiva pode ser determinada de forma subjetiva ou objetiva, através da análise de movimento assistida por computador (19) (20) (21) (22) (23) (24). Para a avaliação da morfologia dos espermatozóides, deve examinar-se uma amostra de esperma do epidídimo (ou ducto deferente) com preparações fixas ou húmidas (25) e, pelo menos, 200 espermatozóides por amostra classificados como normais (a cabeça e o flagelo/cauda têm uma aparência normal) ou anormais. São exemplo de anomalias morfológicas dos espermatozóides a fusão, cabeças isoladas e cabeças e/ou caudas disformes (26). Cabeças de espermatozóides disformes ou grandes podem indicar defeitos na espermiação.

59. Se as amostras de esperma forem congeladas, os esfregaços fixos e as imagens para a análise de mobilidade dos espermatozóides registadas na altura da autópsia (27), as análises subsequentes podem limitar-se aos machos dos grupos de controlo e das dosagens mais elevadas. No entanto, se forem observados efeitos associados ao tratamento, os grupos de dose mais baixa também devem ser avaliados.

▼M5

Autópsia macroscópica

60. Na altura do término do estudo ou em caso de morte prematura, todos os animais P e F_1 são sujeitos a autópsia e examinados macroscopicamente no que se refere a anomalias estruturais ou alterações patológicas. Deve prestar-se especial atenção aos órgãos do sistema reprodutivo. As crias eutanasiadas por se encontrarem moribundas e as crias mortas devem ser registadas e, se não estiverem maceradas, examinadas quanto a potenciais defeitos e/ou causa de morte, e preservadas.

61. Nas fêmeas P e F_1 adultas, é examinado um esfregaço vaginal no dia da autópsia para determinar o estádio do ciclo éstrico e permitir a correlação com a histopatologia dos órgãos reprodutivos. Os úteros de todas as fêmeas P (e fêmeas F_1, se aplicável) são examinados relativamente à presença e número de locais de implantação, sem comprometer a avaliação histopatológica.

Pesagem dos órgãos e preservação de tecido — animais adultos P e F_1

62. Na altura do término do estudo, os pesos corporais e os pesos húmidos dos órgãos abaixo listados de todos os animais P e todos os adultos F_1 das coortes relevantes (como descrito em baixo), são determinados logo que possível após a dissecação, para evitar que sequem. Posteriormente, estes órgãos devem ser preservados em condições adequadas. Salvo indicação em contrário, os órgãos pares podem ser pesados individualmente ou em conjunto, de forma consistente com a prática comum do laboratório em questão.

— Útero (com ovidutos e colo do útero), ovários;

— Testículos, epidídimos (total e cauda para as amostras utilizadas para contagens de espermatozóides);

— Próstata (partes dorsolateral e ventral em conjunto). Impõe-se grande prudência durante o corte do complexo da próstata, de forma a evitar a perfuração das vesículas seminais repletas de fluido. Se se verificar um efeito associado ao tratamento no peso total da próstata, os segmentos dorsolateral e ventral devem ser cuidadosamente dissecados após a fixação e pesados separadamente.

— Vesículas seminais com glândulas de coagulação e respetivos fluidos (como uma unidade);

— Cérebro, fígado, rins, coração, baço, timo, hipófise, tiróide (pós-fixação), glândulas suprarrenais e órgãos e tecidos-alvo conhecidos.

63. Para além dos órgãos acima listados, deve preservar-se amostras dos nervos periféricos, músculo, medula espinal, olho e nervo ótico, trato gastrointestinal, bexiga, pulmão, traqueia (com a tiróide e paratiróide), medula óssea, ducto deferente (machos), glândula mamária (machos e fêmeas) e vagina, em condições adequadas.

64. Todos os órgãos dos animais da coorte 1A devem ser pesados e preservados para histopatologia.

65. Para a investigação de efeitos imunotóxicos induzidos antes e depois do parto, 10 machos e 10 fêmeas dos animais da coorte 1A de cada grupo de tratamento (1 macho ou 1 fêmea por ninhada; todas as ninhadas representadas por pelo menos 1 cria; seleção aleatória) serão sujeitos ao seguinte procedimento no término do estudo:

— pesagem dos nós linfáticos associados e distantes da via de exposição (para além da pesagem das glândulas suprarrenais, do timo e do baço, já realizada em todos os animais da coorte 1A);

▼M5

— análise da subpopulação de linfócitos esplénicos (linfócitos T CD4+ e CD8+, linfócitos B e células exterminadoras naturais), utilizando uma metade do baço; a outra metade do baço é preservada para avaliação histopatológica.

A análise de subpopulações de linfócitos esplénicos em animais não imunizados (coorte 1A) determinará se a exposição está relacionada com uma mudança na distribuição estável imunológica de linfócitos auxiliares (CD4+) ou citotóxicos (CD8+) provenientes do timo ou células exterminadoras naturais (NK) (respostas rápidas às células neoplásicas e agentes patogénicos).

66. Os animais da coorte 1B devem ter os seguintes órgãos pesados e os tecidos correspondentes processados para a fase de bloco:

— Vagina (não pesada)

— Útero com colo do útero

— Ovários

— Testículos (pelo menos um)

— Epidídimos

— Vesículas seminais e glândulas de coagulação

— Próstata

— Hipófise

— Órgãos-alvo identificados

Deve proceder-se à histopatologia na coorte 1B se os resultados da coorte 1A não forem inequívocos, ou em casos de suspeita de tóxicos para o sistema reprodutivo ou endócrino.

67. Coortes 2A e 2B: Ensaio de neurotoxicidade no desenvolvimento (21.º ou 22.º dia pós-natal e descendência adulta). O estudo dos animais da coorte 2A termina após o ensaio comportamental, com pesagem de cérebro registada e neuro-histopatologia completa para efeitos de avaliação de neurotoxicidade. O estudo dos animais da coorte 2B termina no 21.º ou 22.º dia após o nascimento, com a pesagem de cérebro registada e o exame microscópico do mesmo para efeitos de avaliação de neurotoxicidade. A fixação com perfusão é necessária para os animais da coorte 2A e opcional para os animais da coorte 2B, como descrito no método de ensaio B.53 (35).

Pesagem de órgãos e preservação de tecido — animais F_1 desmamados

68. O estudo das crias não selecionadas para coortes, incluindo as de tamanho inferior ao normal, termina após o desmame, no 22.º dia após o nascimento, a não ser que os resultados apontem para a necessidade de investigação subsequente em vida. As crias cujo estudo já tenha terminado são sujeitas a autópsia macroscópica, incluindo uma avaliação dos órgãos reprodutores, consoante descrito nos parágrafos 62 e 63. O cérebro, o baço e o timo de até 10 crias por sexo e por grupo, do maior número possível de ninhadas, devem ser pesados e preservados em condições adequadas. Para além disso, os tecidos mamários destas crias do sexo masculino e feminino podem ser preservados para posterior análise microscópica ([1]) [ver documento de orientações 151 da OCDE (40)]. As anomalias graves e os tecidos-alvo devem ser preservados para possível exame histológico.

([1]) Os estudos mostram que a glândula mamária, especialmente durante o seu desenvolvimento precoce, constitui um parâmetrosensível para a ação do estrogénio. Recomenda-se que os parâmetros que envolvam glândulas mamárias de crias de ambos os sexos sejam incluídos neste método de ensaio, quando validados.

▼M5

Histopatologia — animais P

69. É realizada uma histopatologia completa dos órgãos listados nos parágrafos 62 e 63 para todos os animais P de controlo e sujeitos a uma dose elevada. Os órgãos que apresentem alterações associadas ao tratamento devem também ser examinados em todos os animais nos grupos de dosagem inferior para ajudar a determinar um NOAEL. Para além disso, os órgãos reprodutores de todos os animais com suspeita de fertilidade reduzida, por exemplo aqueles que não conseguiram acasalar, conceber, reproduzir-se ou dar à luz descendência saudável, ou cujo ciclo éstrico ou quantidade, mobilidade ou morfologia dos espermatozóides tenham sido afetados, bem como todas as lesões graves, devem ser sujeitos a avaliação histopatológica.

Histopatologia — animais F_1

Animais da coorte 1

70. É realizada uma histopatologia completa dos órgãos listados nos parágrafos 62 e 63 para todos os animais adultos de controlo e sujeitos a uma dose elevada da coorte 1A. Todas as ninhadas devem estar representadas por pelo menos 1 cria por sexo. Os órgãos e tecidos que apresentem alterações associadas ao tratamento e todas as lesões graves devem também ser examinados em todos os animais dos grupos de dosagem inferior para ajudar a determinar um NOAEL. Para a avaliação de efeitos induzidos antes e depois do parto nos órgãos linfóides, deve ser avaliada a histopatologia dos nós linfáticos e medula óssea colhidos de 10 machos e 10 fêmeas da coorte 1^a, juntamente com a avaliação histopatológica do timo, baço e glândulas suprarrenais já realizada em todos os animais 1A.

71. Os tecidos reprodutivos e endócrinos de todos os animais da coorte 1B, processados para a fase de bloco, consoante descrito no parágrafo 66, devem ser alvo de exame histopatológico em caso de suspeita de tóxicos para o sistema reprodutor ou endócrino. A coorte 1B deve também ser sujeita a exame histológico se os resultados da coorte 1A não forem inequívocos.

72. Os ovários de fêmeas adultas devem conter folículos primordiais e em crescimento, assim como corpos lúteos; assim, um exame histopatológico deve ter como objetivo uma avaliação quantitativa dos folículos primordiais e de baixo crescimento, assim como dos corpos lúteos, em fêmeas F_1; o número de animais, a seleção da secção do ovário e o tamanho da amostra da secção devem ser estatisticamente adequados para o procedimento de avaliação utilizado. A enumeração folicular deve ser realizada em primeiro lugar em animais de controlo e sujeitos a dosagem elevada e, se se verificar um efeito adverso nos últimos, devem ser examinadas as dosagens inferiores. O exame deve incluir a enumeração da quantidade de folículos primordiais, que podem ser combinados com folículos de baixo crescimento, para comparação entre os ovários dos animais tratados e dos animais de controlo [ver documento de orientações 151 da OCDE (40)]. A avaliação dos corpos lúteos deve ser realizada em paralelo com o ensaio ao ciclo éstrico, de modo a que o estádio do ciclo possa ser tido em consideração na avaliação. O oviduto, o útero e a vagina são examinados quanto ao desenvolvimento típico do órgão.

73. São realizados exames de histopatologia testicular detalhados nos machos F_1 de modo a identificar efeitos associados ao tratamento na diferenciação e desenvolvimento dos testículos e na espermatogénese (38). Quando possível, devem ser examinadas secções da rede testicular. A cabeça, corpo e cauda do epidídimo e o ducto deferente são examinados quanto ao desenvolvimento típico do órgão, assim como quanto aos parâmetros requeridos para os machos P.

▼M5

Animais da coorte 2

74. É realizada uma neuro-histopatologia de todos os animais de controlo e sujeitos a uma dose elevada da coorte 2A, por sexo, a seguir ao término do ensaio neurocomportamental (depois do 75.º mas antes do 90.º dia após o nascimento). É realizada a histopatologia do cérebro de todos os animais de controlo e sujeitos a uma dose elevada da coorte 2B, por sexo, no 21.º ou 22.º dia após o nascimento. Os órgãos ou tecidos que apresentem alterações associadas ao tratamento devem também ser examinados nos animais dos grupos de dosagem inferior, para ajudar a determinar um NOAEL. Nos animais das coortes 2A e 2B, são examinadas várias secções do cérebro para permitir o exame dos bolbos olfativos, córtex cerebral, hipocampo, gânglios basais, tálamo, hipotálamo, centro do cérebro (forame cego, calote e pedúnculos cerebrais), tronco cerebral e cerebelo. Apenas na coorte 2A, são examinados os olhos (retina e nervo ótico) e amostras dos nervos periféricos, músculo e medula espinal. Todos os procedimentos neuro-histológicos devem estar em conformidade com o método de ensaio B.53 (35).

75. As avaliações morfométricas (quantitativas) devem ser realizadas em áreas representativas do cérebro (secções homólogas selecionadas cuidadosamente com base em marcos microscópicos) e podem incluir medições lineares ou espaciais de regiões específicas do cérebro. Pelo menos três secções consecutivas devem ser retiradas em cada marco (nível), de modo a selecionar a secção mais homóloga e representativa do cérebro específico a avaliar. O neuropatologista deve verificar com cuidado se as secções preparadas para a medição são equivalentes às outras do conjunto de amostras e, assim, indicadas para inclusão, uma vez que as medições lineares, em particular, podem variar ao longo de uma distância relativamente curta (28). As secções não homólogas não devem ser utilizadas. O objetivo é colher amostras de todos os animais reservados para este propósito (10/sexo/nível de dose); porém, pode também ser adequada uma quantidade menor. No entanto, amostras de menos de 6 animais/sexo/nível de dose não são geralmente consideradas suficientes para efeitos deste método de ensaio. Pode recorrer-se à estereologia para identificar efeitos associados ao tratamento em parâmetros como o volume ou o número de células em regiões neuroanatómicas específicas. Todos os aspetos da preparação de amostras de tecido, desde a fixação do tecido, dissecação das amostras de tecido, processamento do tecido até à coloração de lâminas, devem seguir uma conceção equilibrada para que cada lote contenha amostras representativas de cada grupo de dosagem. Quando se utilizarem análises morfométricas ou estereológicas, o tecido do cérebro deve ser envolvido em meios adequados em todos os níveis de dose em simultâneo, de modo a evitar artefactos de contração associados a um armazenamento prolongado no fixador.

RELATÓRIOS

Dados

76. Os dados são registados individualmente e resumidos sob a forma de tabela. Se for caso disso, para cada grupo de ensaio e cada geração, deve registar-se o seguinte: número de animais no início do ensaio, número de animais encontrados mortos durante o ensaio ou eutanasiados, hora de todos os óbitos, naturais ou por eutanásia, número de animais férteis, número de fêmeas grávidas, número de fêmeas a dar à luz uma ninhada e número de animais que apresenta sinais de toxicidade. Também deve ser registada uma descrição da toxicidade, incluindo a hora de início, duração e gravidade.

77. Os resultados numéricos devem ser avaliados através de um método estatístico adequado e aceite. Os métodos estatísticos devem ser selecionados no âmbito da definição do estudo e mencionar, de modo adequado, os dados fora do normal (p. ex.: dados de contagem), não considerados (p. ex.: tempo de observação limitado), não independentes (p. ex.: efeitos da ninhada e medições repetidas) e as variâncias desiguais. Os modelos lineares generalizados mistos e modelos de dose-resposta cobrem uma vasta classe de

▼M5

ferramentas analíticas que podem ser adequadas para os dados gerados no âmbito deste método de ensaio. O relatório deve incluir informações suficientes sobre os métodos de análise e o programa informático utilizado, para que o revisor/estatístico independente possa avaliar/reavaliar a análise.

Avaliação de resultados

78. As conclusões devem ser avaliadas em termos de efeitos observados, incluindo as autópsias e as constatações microscópicas. A avaliação inclui a relação, ou a falta dela, entre a dose e a presença, incidência e gravidade das anomalias, incluindo lesões graves. Os órgãos-alvo, fertilidade, anomalias clínicas, desempenho reprodutivo e da ninhada, alterações do peso corporal, mortalidade e quaisquer outros efeitos tóxicos e no desenvolvimento também devem ser avaliados. Deve prestar-se especial atenção às alterações específicas do sexo. As propriedades físico-químicas do produto químico em estudo e, se disponíveis, os dados de toxicocinética, incluindo transferência placentária e excreção no leite, devem ser tidos em consideração durante a avaliação dos resultados do ensaio.

Relatório de ensaio

79. O relatório de ensaio deve incluir as seguintes informações obtidas no presente estudo a partir dos animais P, F_1 e F_2 (quando relevante):

Produto químico em estudo:

— Todas as informações disponíveis e relevantes sobre o produto químico em estudo e sobre as suas propriedades toxicocinéticas e toxicodinâmicas;

— Dados de identificação do produto;

— Pureza;

Veículo (se adequado):

— Justificação da escolha do veículo, se outro que não água;

Animais de ensaio:

— Espécie/estirpe utilizada;

— Número, idade e sexo dos animais;

— Origem, condições de alojamento, dieta, materiais de nidificação, etc.;

— Peso individual dos animais no início do ensaio;

— Dados do esfregaço vaginal para as fêmeas P antes do início do tratamento (se forem recolhidos dados nessa altura);

— Registos de emparelhamento da geração P, indicando o macho e a fêmea de um acasalamento e o grau de sucesso do mesmo;

— Registos da ninhada de origem para os adultos da geração F_1;

Condições de ensaio:

— Justificação para a escolha do nível de dosagem;

— Detalhes sobre a formulação do produto químico em estudo/preparação da dieta, concentrações alcançadas;

▼M5

— Estabilidade e homogeneidade da preparação no veículo ou agente de transporte (p. ex.: dieta, água potável), no sangue e/ou no leite, nas condições de utilização e armazenamento entre as utilizações;

— Detalhes da administração do produto químico em estudo;

— Conversão da concentração do produto químico em estudo (ppm) na dieta/água potável para a dose alcançada (mg/kg de peso corporal/dia), se aplicável;

— Detalhes sobre a qualidade dos alimentos e da água (incluindo composição da dieta, se disponível);

— Descrição detalhada sobre os procedimentos de randomização na seleção das crias para abate e na atribuição das crias aos grupos de ensaio;

— Condições ambientais;

— Lista do pessoal que participa no estudo, incluindo a respetiva formação profissional;

Resultados (resumo e dados individuais por sexo e dose):

— Consumo de alimentos, consumo de água, se disponível, eficiência alimentar (aumento do peso corporal por grama de alimentos consumidos, exceto para o período de coabitação e durante a amamentação) e consumo do produto químico em estudo (administração na dieta/água potável) para os animais P e F_1;

— Dados de absorção (se disponíveis);

— Dados sobre o peso corporal dos animais P;

— Dados sobre o peso corporal dos animais F_1 selecionados, após o desmame;

— Hora do óbito durante o estudo ou indicação de que os animais sobreviveram até ao término do estudo;

— Natureza, gravidade e duração das observações clínicas (reversíveis ou não);

— Hematologia, análises à urina e dados químicos clínicos, incluindo TSH e T4;

— Análise fenotípica das células do baço (células T, B, NK);

— Celularidade da medula óssea;

— Dados de resposta tóxica;

— Número de fêmeas P e F_1 com ciclo éstrico normal ou anormal e duração do ciclo;

— Tempo até ao acasalamento (intervalo pré-coito, número de dias entre o emparelhamento e o acasalamento);

— Efeitos tóxicos ou outros na reprodução, incluindo números e percentagens de animais que alcançaram o acasalamento, gravidez, parto e amamentação, de machos que induziram gravidez, de fêmeas com sinais de distócia/parto prolongado ou difícil;

— Duração da gravidez e, se disponível, do parto;

— Número de implantações, tamanho da ninhada e percentagem de crias do sexo masculino;

— Número e percentagem de perda pós-implantação, nados-vivos e nados-mortos;

▼**M5**

— Dados sobre o peso da ninhada e das crias (machos, fêmeas e combinados), número de animais de tamanho inferior ao normal, se constatado;

— Número de crias com anomalias manifestamente visíveis;

— Efeitos tóxicos ou outros na descendência, crescimento pós-natal, viabilidade, etc.;

— Dados sobre marcos físicos em crias e outros dados sobre o desenvolvimento pós-natal;

— Dados sobre a maturação sexual dos animais F_1;

— Dados sobre observações funcionais em crias e adultos, quando aplicável;

— Peso corporal no momento do sacrifício e peso relativo e absoluto dos órgãos dos animais P e animais adultos F_1;

— Dados obtidos por autópsia;

— Descrição detalhada de todos os achados histopatológicos;

— Número total de espermatozóides na cauda do epidídimo, percentagem de espermatozóides com mobilidade progressiva; percentagem de espermatozóides com morfologia normal e percentagem de espermatozóides com cada uma das anomalias identificadas nos machos P e F_1;

— Números e estádios de maturação dos folículos contidos nos ovários das fêmeas P e F_1, quando aplicável;

— Enumeração de corpos lúteos nos ovários das fêmeas F_1;

— Tratamento estatístico dos resultados, quando adequado;

Parâmetros da coorte 2:

— Descrição detalhada dos métodos utilizados para uniformizar observações e procedimentos, assim como definições operacionais para as observações de classificação;

— Lista de todos os procedimentos de ensaio utilizados e justificação da respetiva utilização;

— Detalhes de procedimentos comportamentais/funcionais, neuropatológicos e morfométricos utilizados, incluindo informações e detalhes sobre dispositivos automáticos;

— Procedimentos para calibração e garantia de equivalência de dispositivos e equilibragem dos grupos de tratamento em procedimentos de ensaio;

— Breve justificação que explique quaisquer decisões que envolvam julgamento profissional;

— Descrição detalhada de todos os achados comportamentais/funcionais, neuropatológicos e morfométricos por sexo e grupo de dosagem, incluindo aumentos e diminuições em relação aos controlos;

— Peso do cérebro;

— Quaisquer diagnósticos decorrentes de sinais e lesões neurológicas, incluindo doenças ou condições naturais;

— Imagens de constatações exemplares;

— Imagens de baixa resolução para comprovar a homologia das secções utilizadas para morfometria;

▼M5

— Tratamento estatístico dos resultados, incluindo modelos estatísticos utilizados para analisar os dados e os resultados, independentemente de terem sido significativos ou não;

— Relação de quaisquer outros efeitos tóxicos para uma conclusão sobre o potencial neurotóxico do produto químico em estudo, por sexo e grupo de dosagem;

— Impacto de quaisquer informações toxicocinéticas nas conclusões;

— Dados que suportam a fiabilidade e sensibilidade do método de ensaio (ou seja, dados positivos e históricos de controlo);

— Relações, se existentes, entre os efeitos neuropatológicos e funcionais;

— NOAEL ou dose de referência para crias e descendentes, por sexo e grupo de dosagem;

— Discussão da interpretação global dos dados com base nos resultados, incluindo uma conclusão sobre se o produto químico provocou, ou não, neurotoxicidade no desenvolvimento e o NOAEL;

Parâmetros da coorte 3:

— Títulos de anticorpos IgM séricos (sensibilização a SRBC ou KLH), ou unidades PFC IgM esplénicas (sensibilização a SRBC);

— O desempenho do método TDAR deve ser confirmado como parte do processo de otimização nos laboratórios que realizam o ensaio pela primeira vez e periodicamente (p. ex.: anualmente) por todos os laboratórios;

— Discussão da interpretação global dos dados com base nos resultados, incluindo uma conclusão sobre se o produto químico provocou, ou não, imunotoxicidade no desenvolvimento e NOAEL;

Discussão dos resultados

Conclusões, incluindo valores de NOAEL nos progenitores e na descendência

Todas as informações que não tenham sido obtidas durante o estudo, mas que sejam úteis para a interpretação dos resultados (p. ex.: semelhanças com os efeitos de quaisquer neurotóxicos conhecidos) devem também ser disponibilizadas.

Interpretação dos Resultados

80. Um «Estudo alargado de toxicidade durante a reprodução numa geração» proporcionará informações sobre os efeitos da exposição repetida a produtos químicos durante todas as fases do ciclo reprodutivo, conforme necessário. Em particular, o estudo providencia informações sobre o sistema reprodutivo e sobre os parâmetros de desenvolvimento, crescimento, sobrevivência e funcionais da descendência até ao 90.º dia após o nascimento.

81. A interpretação dos resultados do estudo deve ter em consideração todas as informações disponíveis sobre o produto químico, incluindo propriedades físico-químicas, toxicocinéticas e toxicodinâmicas, informações relevantes disponíveis sobre análogos estruturais e resultados de estudos de toxicidade anteriores com o produto químico em estudo (p. ex.: toxicidade aguda, toxicidade após aplicação repetida, estudos mecanísticos e estudos que avaliam se existem diferenças qualitativas e quantitativas substanciais entre espécies no que respeita às propriedades metabólicas *in vivo*/*in vitro*). Os resultados da autópsia macroscópica e da pesagem dos órgãos devem ser avaliados no contexto das observações de outros estudos com dose repetida, quando tal for viável. As reduções no crescimento das crias podem ser consideradas relativamente a uma influência do produto químico em estudo na composição do leite (29).

▼M5

Coorte 2 (Neurotoxicidade no desenvolvimento)

82. Os efeitos neurocomportamentais e neuropatológicos podem ser interpretados no contexto de todos os achados, recorrendo a uma abordagem de suficiência de prova com parecer de peritos. Devem ser discutidos os padrões das constatações comportamentais ou morfológicas, se presentes, assim como a evidência de uma relação dose-resposta. A avaliação de neurotoxicidade no desenvolvimento, incluindo estudos epidemiológicos em humanos ou relatórios de caso e estudos experimentais em animais (p. ex.: dados toxicocinéticos, informação sobre estrutura/atividade e dados de outros estudos de toxicidade), deve ser incluída nesta caracterização. A avaliação dos dados deve incluir uma discussão da significância biológica e estatística. A avaliação deve incluir a relação, se existente, entre alterações neuropatológicas e comportamentais. Para orientações quanto à interpretação dos resultados de neurotoxicidade no desenvolvimento, consultar o método de ensaio B.53 (35) e Tyl *et al.*, 2008 (31).

Coorte 3 (Imunotoxicidade no desenvolvimento)

83. A supressão ou o reforço da função imunitária, conforme estipulado pelas TDAR (respostas de anticorpos dependentes de células T) deve avaliar-se no contexto de todas as observações constatadas. A significância dos resultados de TDAR deve ser sustentada por outros efeitos em indicadores relacionados com a imunologia (p. ex.: celularidade da medula óssea, peso e histopatologia dos tecidos linfoides, distribuição do subgrupo de linfócitos). Os efeitos estabelecidos por TDAR podem ser menos significativos no caso de outras toxicidades constatadas em concentrações de menor exposição.

84. O documento de orientações 43 da OCDE deve ser consultado como fonte de ajuda na interpretação dos resultados sobre a reprodução e da neurotoxicidade (26).

REFERÊNCIAS

1. Cooper, R.L., J.C. Lamb, S.M. Barlow, K. Bentley, A.M. Brady, N. Doerr, D.L. Eisenbrandt, P.A. Fenner-Crisp, R.N. Hines, L.F.H. Irvine, C.A. Kimmel, H. Koeter, A.A. Li, S.L. Makris, L.P. Sheets, G.J.A. Speijers and K.E. Whitby (2006), 'A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment', *Critical Reviews in Toxicology*, 36, 69-98.

2. Thigpen, J.E., K.D.R. Setchell, K.B. Ahlmark, J. Locklear, T. Spahr, G.F. Leviness, M.F. Goelz, J.K. Haseman, R.R. Newbold, and D.B. Forsythe (1999), 'Phytoestrogen Content of Purified Open and Closed Formula Laboratory Animal Diets', *Lab. Anim. Sci.*, 49, 530- 536.

3. Zoetis, T. and I. Walls (2003), Principles and Practices for Direct Dosing of Pre-Weaning Mammals in Toxicity Testing and Research, ILSI Press, Washington, DC.

4. Moser, V.C., I. Walls and T. Zoetis (2005), 'Direct Dosing of Preweaning Rodents in Toxicity Testing and Research: Deliberations of an ILSI RSI Expert Working Group', *International Journal of Toxicology*, 24, 87-94.

5. Conolly, R.B., B.D. Beck, and J.I. Goodman (1999), 'Stimulating Research to Improve the Scientific Basis of Risk Assessment', *Toxicological Sciences*, 49, 1-4.

6. Ulbrich, B. and A.K. Palmer (1995), 'Detection of Effects on Male Reproduction — a Literature Survey', *Journal of the American College of Toxicologists*, 14, 293-327.

7. Mangelsdorf, I., J. Buschmann and B. Orthen (2003), 'Some Aspects Relating to the Evaluation of the Effects of Chemicals on Male Fertility', *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 37, 356-369.

▼**M5**

8. Sakai, T., M. Takahashi, K. Mitsumori, K. Yasuhara, K. Kawashima, H. Mayahara and Y. Ohno (2000). 'Collaborative work to evaluate toxicity on male reproductive organs by repeated dose studies in rats — overview of the studies', *Journal of Toxicological Sciences*, 25, 1-21.

9. Creasy, D.M. (2003), 'Evaluation of Testicular Toxicology: A Synopsis and Discussion of the Recommendations Proposed by the Society of Toxicologic Pathology', *Birth Defects Research*, Part B, 68, 408-415.

10. Goldman, J.M., A.S. Murr, A.R. Buckalew, J.M. Ferrell and R.L. Cooper (2007), 'The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies', *Birth Defects Research*, Part B, 80 (2), 84-97.

11. Sadleir, R.M.F.S. (1979), 'Cycles and Seasons', in C.R. Auston and R.V. Short (eds.), *Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization*, Cambridge, New York.

12. Gallavan, R.H. Jr, J.F. Holson, D.G. Stump, J.F. Knapp and V.L. Reynolds (1999), 'Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights', *Reproductive Toxicology,* 13: 383-390.

13. Korenbrot, C.C., I.T. Huhtaniemi and R.I. Weiner (1977), 'Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat', *Biological Reproduction*, 17, 298-303.

14. Ladics, G.S. (2007), 'Use of SRBC Antibody Responses for Immunotoxicity Testing', *Methods*, 41, 9-19.

15. Gore, E.R., J. Gower, E. Kurali, J.L. Sui, J. Bynum, D. Ennulat and D.J. Herzyk (2004), 'Primary Antibody Response to Keyhole Limpet Hemocyanin in Rat as a Model for Immunotoxicity Evaluation', *Toxicology*, 197, 23--35.

16. Gray, L.E., J. Ostby, J. Ferrell, G. Rehnberg, R. Linder, R. Cooper, J. Goldman, V. Slott and J. Laskey (1989), 'A Dose-Response Analysis of Methoxychlor-Induced Alterations of Reproductive Development and Function in the Rat', *Fundamental and Applied Toxicology*, 12, 92-108.

17. Robb, G.W., R.P. Amann and G.J. Killian (1978), 'Daily Sperm Production and Epididymal Sperm Reserves of Pubertal and Adult Rats', *Journal of Reproduction and Fertility*,54, 103-107.

18. Klinefelter, G.R., L.E. Jr Gray and J.D. Suarez (1991), 'The Method of Sperm Collection Significantly Influences Sperm Motion Parameters Following Ethane Dimethanesulfonate Administration in the Rat'. *Reproductive Toxicology*,5, 39-44.

19. Seed, J., R.E. Chapin, E.D. Clegg., L.A. Dostal, R.H. Foote, M.E. Hurtt, G.R. Klinefelter, S.L. Makris, S.D. Perreault, S. Schrader, D. Seyler, R. Sprando, K.A. Treinen, D.N. Veeramachaneni and L.D. Wise (1996), 'Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog: a Consensus Report', *Reproductive Toxicology*, 10, 237-244.

20. Chapin, R.E., R.S. Filler, D. Gulati, J.J. Heindel, D.F. Katz, C.A. Mebus, F. Obasaju, S.D. Perreault, S.R. Russell and S. Schrader (1992), 'Methods for Assessing Rat Sperm Motility', *Reproductive Toxicology*, 6, 267-273.

21. Klinefelter, G.R., N.L. Roberts and J.D. Suarez (1992), 'Direct Effects of Ethane Dimethanesulphonate on Epididymal Function in Adult Rats: an *In Vitro* Demonstration', *Journal of Andrology*, 13, 409-421.

22. Slott, V.L., J.D. Suarez and S.D. Perreault (1991), 'Rat Sperm Motility Analysis: Methodologic Considerations', *Reproductive Toxicology*, 5, 449--458.

▼**M5**

23. Slott, V.L., and S.D. Perreault (1993), 'Computer-Assisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using the Hamilton-Thorn Motility Analyzer', *Methods in Toxicology, Part A*, Academic, Orlando, Florida. p. 319-333.

24. Toth, G.P., J.A. Stober, E.J. Read, H. Zenick and M.K. Smith (1989), 'The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorhydrin Administration: Methodologic and Statistical Considerations', *Journal of Andrology*, 10, 401-415.

25. Linder, R.E., L.F. Strader, V.L. Slott and J.D. Suarez (1992), 'Endpoints of Spermatoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants', *Reproductive Toxicology*, 6, 491-505.

26. OCDe (2008), Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment, *Series on Testing and Assessment*, No. 43, ENV/ /JM/MONO(2008)16, OECD, Paris.

27. Working, P.K., M. Hurtt (1987), 'Computerized Videomicrographic Analysis of Rat Sperm Motility', *Journal of Andrology*, 8, 330-337.

28. Bolin, B., R. Garman, K. Jensen, G. Krinke, B. Stuart, and an ad Hoc Working Group of the STP Scientific and Regulatory Policy Committee (2006), 'A 'Best Practices' Approach to Neuropathologic Assessment in Developmental Neurotoxicity Testing — for Today', *Toxicological Pathology*, 34, 296-313.

29. Stütz, N., B. Bongiovanni, M. Rassetto, A. Ferri, A.M. Evangelista de Duffard, and R. Duffard (2006), 'Detection of 2,4-dichlorophenoxyacetic Acid in Rat Milk of Dams Exposed During Lactation and Milk Analysis of their Major Components', *Food Chemicals Toxicology*, 44, 8-16.

30. Thigpen, JE, K.D.R. Setchell, J.K. Haseman, H.E. Saunders, G.F. Caviness, G.E. Kissling, M.G. Grant and D.B. Forsythe (2007), 'Variations in Phytoestrogen Content between Different Mill Dates of the Same Diet Produces Significant Differences in the Time of Vaginal Opening in CD-1 Mice and F344 Rats but not in CD Sprague Dawley Rats', *Environmental health perspectives,* 115(12), 1717-1726.

31. Tyl, R.W., K. Crofton, A. Moretto, V. Moser, L.P. Sheets and T.J. Sobotka (2008), 'Identification and Interpretation of Developmental Neurotoxicity Effects: a Report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute Expert Working Group on Neurodevelopmental Endpoints', *Neurotoxicology and Teratology*, 30: 349-381.

32. OECD (1996), *Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test*, OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 422, OECD, Paris.

33. Capítulo B.43 do presente anexo, 'Ensaio de neurotoxicidade em roedores'.

34. OCDE (2000), Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluations, *Series on Testing and Assessment*, No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

35. Capítulo B.53 do presente anexo, 'Estudo de neurotoxicidade durante o desenvolvimento'.

36. Capítulo B.54 do presente anexo, 'Bioensaio uterotrófico em roedores: Ensaio de despistagem a curto prazo de propriedades estrogénicas'.

37. Capítulo B.55 do presente anexo, 'Bioensaio de Hershberger no rato: Ensaio de despistagem a curto prazo de propriedades (anti)androgénicas'.

▼**M5**

38. OCDE (2009), Guidance Document for Histologic Evalution of Endocrine and Reproductive Test in Rodents, *Series on Testing and Assessment*, No. 106, OECD, Paris.

39. OCDE (2011), Guidance Document on the Current Implementation of Internal Triggers in the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study in the United States and Canada, *Series on Testing and Assessment*, No. 117, ENV/JM/MONO(2011)21, OECD, Paris.

40. OCDE (2013), Guidance Document supporting TG 443: Extended One Generation Reproductive Toxicity Study, *Series on Testing and Assessment*, No. 151, OECD, Paris.

▼**M5**

Apêndice 1

Medidas e observações incluídas na bateria de observação funcional (coorte 2a)

Gaiola e Campo Aberto	Manipulativas	Fisiológicas
Postura	Facilidade de remoção	Temperatura
Tonicoclónico involuntário	Facilidade de manipulação	Peso corporal
Fechamento das pálpebras	Tónus muscular	Reação pupilar
Piloereção	Reação à aproximação	Tamanho das pupilas
Salivação	Reação ao toque	
Lacrimação	Resposta auditiva	
Vocalizações	Reação ao beliscão na cauda	
Levantar nas patas traseiras	Reação de endireitamento	
Anormalidades da marcha	Abdução das patas ao aterrar	
Excitação	Força de preensão dos membros dianteiros	
Estereotipia	Força de preensão dos membros traseiros	
Comportamento estranho		
Manchas		
Anormalidades respiratórias		

▼**M5**

Apêndice 2

DEFINIÇÕES

Produto químico: uma substância ou uma mistura.

Produto químico em estudo: qualquer substância ou mistura estudada utilizando este método de ensaio.

▼M5

B.57. ENSAIO DE ESTEROIDOGÉNESE H295R

INTRODUÇÃO

1. Este método é equivalente ao *Test Guideline* TG 456 (2011) da OCDE. A OCDE iniciou em 1998 uma atividade altamente prioritária com o objetivo de rever as diretrizes em vigor para a pesquisa e o ensaio de produtos químicos com possíveis efeitos de perturbação endócrina e desenvolver novas diretrizes. O *Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals* da OCDE, (2002) compreende cinco níveis, cada um dos quis corresponde a um nível diferente de complexidade biológica (1). O ensaio de esteroidogénese H295R *in vitro* descrito no presente método de ensaio utiliza uma linhagem celular do adenocarcinoma humano (células NCI-H295R) e constitui um ensaio *in vitro* de nível 2, proporcionando dados mecanísticos a utilizar para fins de monitorização e priorização. O desenvolvimento e a normalização do ensaio para a pesquisa dos efeitos dos produtos químicos na esteroidogénese, designadamente na produção de 17β-estradiol (E2) e de testosterona (T), resultaram de um processo em várias fases. O ensaio H295R foi otimizado e validado (2) (3) (4) (5).

2. O objetivo do ensaio de esteroidogénese H295R consiste em detetar produtos químicos que afetem a produção de E2 e T. O ensaio H295R tem por objetivo identificar substâncias xenobióticas que tenham por alvo(s) os componentes endógenos que constituem o mecanismo bioquímico intracelular que, numa sequência de reações, conduz à produção de E2 e/ou T a partir do colesterol. O ensaio H295R não tem por objetivo identificar produtos químicos que afetem a esteroidogénese através de efeitos no sistema hipotálamo-hipófise-gónadas (HPG). O objetivo consiste apenas em obter uma resposta POSITIVA/NEGATIVA quanto ao potencial de um produto químico de induzir ou inibir a produção de T e E2; podem, contudo, obter-se resultados quantitativos em certos casos (ver pontos 53 e 54). Os resultados do ensaio são expressos em alterações relativas da produção de hormonas relativamente aos ensaios de controlo com solvente (SC). O objetivo não consiste em obter informações específicas sobre os mecanismos implicados na interação do produto químico em estudo com o sistema endócrino. Foram realizadas investigações com a linhagem celular tendo em vista identificar efeitos nas enzimas específicos e nas hormonas intermediárias, como a progesterona (2).

3. As definições e abreviaturas utilizadas no presente método de ensaio são descritas no apêndice. O apêndice I-III do documento da OCDE intitulado *Multi-Laboratory Validation of the H295R Steroidogenesis Assay to Identify Modulators of Testosterone and Estradiol Production* (4) inclui um protocolo pormenorizado com instruções para a preparação das soluções, a cultura das células e a execução das várias fases do ensaio.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES

4. Na biossíntese das hormonas sexuais esteroides participam cinco enzimas diferentes, que catalisam seis reações específicas. A conversão enzimática do colesterol em pregnenolona, promovida pela enzima CYP11A de clivagem da cadeia lateral do colesterol do citocromo P450, constitui o passo inicial numa série de reações bioquímicas que conduzem à síntese de produtos finais esteroides. Consoante a ordem das duas reações seguintes, o mecanismo da esteroidogénese divide-se em duas vias, a via dos Δ5-hidroxiesteroides e a via dos Δ4-cetoesteroides, que convergem na produção de androstenodiona (figura 1).

5. A androstenodiona é convertida em testosterona (T) por ação da desidrogenase dos 17β-hidroxiesteroides (17β-HSD). A testosterona é simultaneamente um intermediário e um produto final (hormona). Nos machos, pode ser convertida em di-hidrotestosterona (DHT) por ação da 5α-redutase presente na membrana celular, no invólucro nuclear e no retículo endoplásmico dos tecidos-alvo da ação androgénica, como a próstata e as vesículas seminais. A DHT é um androgénio significativamente mais potente que a testosterona, sendo também considerada um produto final hormonal. O ensaio H295R não determina a DHT (ver ponto 10).

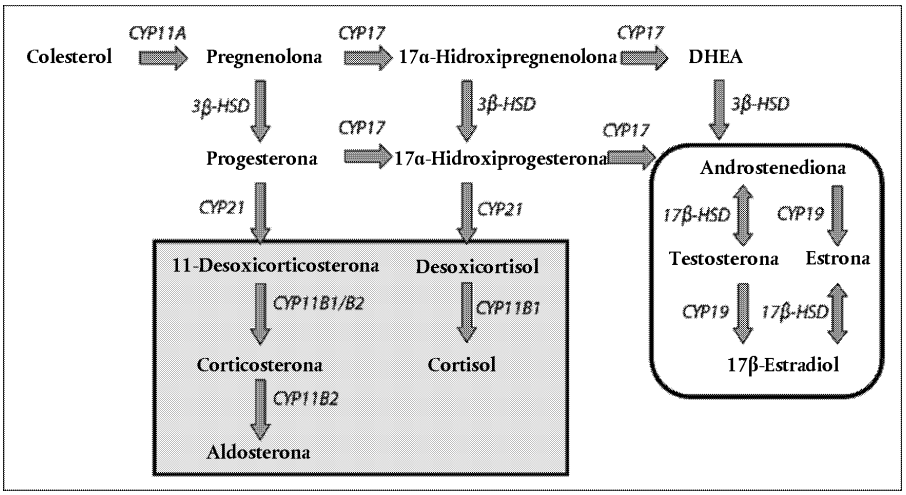
▼M5

6. A aromatase (CYP19) é a enzima que, no processo da esteroidogénese, promove a conversão das substâncias androgénicas em estrogénicas, nomeadamente a testosterona (T) em 17β-estradiol (E2) e a androstenodiona em estrona. A E2 e a T são consideradas produtos finais hormonais no processo da esteroidogénese.

7. A especificidade da atividade de liase da CYP17 relativamente aos substratos intermediários difere em função das espécies. No homem, a enzima favorece os substratos da via dos Δ5-hidroxiesteroides (pregnenolona), enquanto, no rato, são favorecidos os substratos da via dos Δ4-cetoesteroides (progesterona) (19). Estas diferenças na atividade de liase da CYP17 permitem explicar algumas diferenças específicas das espécies na resposta aos produtos químicos que alteram a esteroidogénese *in vivo* (6). Observou-se que as células H295 refletem mais estreitamente a expressão das enzimas adrenais e o mecanismo de produção de esteroides no homem adulto (20), embora, no respeitante à síntese de androgénios, produzam enzimas para as vias dos Δ5-hidroxiesteroides e dos Δ4-cetoesteroides (7) (11) (13) (15).

Figura 1

Mecanismo da esteroidogénese nas células H295R



Nota:

As enzimas são indicadas em itálico, as hormonas em negrito e as setas indicam a direção do processo. O fundo cinzento indica as vias e os produtos corticosteróides. As hormonas sexuais e respetivas vias estão envoltas por uma linha circular. CYP = citocromo P450; HSD = desidrogenase dos hidroxiesteroides; DHEA = desidroepiandrosterona

8. A linhagem celular do adenocarcinoma humano H295R constitui um modelo útil para a investigação *in vitro* dos efeitos na síntese de hormonas esteroides (2) (7) (8) (9) (10). A linhagem celular H295R exprime genes que codificam todas as enzimas-chave da esteroidogénese atrás referidas (11) (15) (figura 1). Trata-se de uma propriedade única, dado que a expressão *in vivo* desses genes é específica dos tecidos e das fases de desenvolvimento, sendo que, em geral, um só tecido ou uma única fase de desenvolvimento não exprime todos os genes implicados na esteroidogénese (2). As células H295R têm características fisiológicas de células adrenais fetais humanas não diferenciadas por zonas (11). As células constituem um sistema *in vitro* específico, na medida em que têm a capacidade de produzir todas as hormonas esteroides do córtex adrenal e das gónadas dos adultos, permitindo observar, em simultâneo, efeitos na síntese de corticosteróides e de hormonas sexuais esteroides como os androgénios e os estrogénios, embora o ensaio tenha sido validado apenas para a deteção de T e E2. As alterações registadas pelo sistema de ensaio, expressas em alterações na

▼M5

produção de T e E2, podem decorrer duma vasta gama de interações diversas dos produtos químicos em estudo com as funções esteroidogénicas expressas pelas células H295R. Essas alterações abrangem a modulação da expressão, a síntese ou a ação das enzimas implicadas na produção, transformação ou eliminação das hormonas esteroides (12) (13) (14). A inibição da produção hormonal pode ser devida à ligação competitiva direta a uma enzima implicada no processo, ao impacto em cofatores como o NADPH (fosfato de dinucleótido nicotinamida-adenina) e o cAMP (monofosfato de adenosina cíclica), e/ou a um aumento do metabolismo dos esteroides ou à supressão da expressão dos genes que codificam determinadas enzimas no mecanismo da esteroidogénese. Enquanto a inibição pode resultar de processos diretos ou indiretos implicados na produção das hormonas, a indução é, em geral, de natureza indireta — por exemplo, afetando cofatores como o NADPH e o cAMP (caso da forskolina), reduzindo o metabolismo dos esteroides (13) e/ou regulando positivamente a expressão dos genes esteroidogénicos.

9. O ensaio H295R apresenta várias vantagens:

— Permite a deteção de aumentos e reduções na produção de T e E2;

— Permite a avaliação direta do possível impacto de um produto químico na viabilidade das células ou na citotoxicidade. Esta característica é importante, na medida em que permite a distinção entre os efeitos devidos à citotoxicidade e os efeitos devidos à interação direta dos produtos químicos com o mecanismo da esteroidogénese, o que não é possível por recurso a sistemas de explantes de tecidos constituídos por vários tipos de células com sensibilidades e funcionalidades diversas;

— Não exige a utilização de animais;

— A linhagem celular H295R encontra-se disponível no comércio.

10. As principais limitações do ensaio são as seguintes:

— A sua capacidade metabólica é desconhecida, sendo, provavelmente, bastante limitada, pelo que o ensaio não permite identificar a ação de produtos químicos que necessitem de ativação metabólica.

— Uma vez que é obtida a partir de tecido adrenal, a linhagem H295R contém as enzimas que promovem a produção dos glucocorticoides e dos mineralocorticoides, bem como das hormonas sexuais; os efeitos na produção de glucocorticoides e mineralocorticoides podem condicionar os teores de T e E2 observados no ensaio.

— Não determina a DHT, pelo que, em princípio, não permite detetar produtos químicos que inibem a 5α-redutase, caso em que pode recorrer-se ao ensaio de Hershberger (16).

— Não permite detetar produtos químicos que interfiram com a esteroidogénese ao nível do eixo hipotálamo-pituitária-gónadas (HPG), caso que só pode ser estudado com animais intactos.

PRINCÍPIO DO ENSAIO

11. O objetivo do ensaio consiste na deteção de produtos químicos que afetem a produção de testosterona e de E2. A testosterona é também um intermediário na produção de E2. O ensaio permite detetar, em especial, produtos químicos que inibam ou induzam as enzimas que promovem a esteroidogénese.

▼M5

12. Em geral, o ensaio é realizado em condições normalizadas de cultura celular, em placas de cultura com 24 alvéolos. Em alternativa, podem utilizar-se placas de outras dimensões; contudo, a inoculação e as condições experimentais devem ser ajustadas em conformidade, de forma a manter o respeito dos critérios de desempenho.

13. Após um período de aclimação de 24 horas em placas multialvéolos, as células são expostas durante 48 horas a sete concentrações do produto químico em estudo, pelo menos em triplicado. Adicionam-se concentrações fixas de um solvente e de um inibidor ou promotor conhecido da produção de hormonas, na qualidade de controlos negativos e positivos. No final do período de exposição, é removido o meio de cada alvéolo. A viabilidade das células em cada alvéolo é analisada imediatamente após a remoção do meio. As concentrações de hormonas no meio podem ser medidas por diversos métodos, nomeadamente por recurso a conjuntos de determinação de hormonas disponíveis no comércio e/ou técnicas instrumentais como a cromatografia em fase líquida acoplada com espetrometria de massa (LC-MS). Os dados são expressos em fatores de alteração relativamente ao controlo com solvente e à menor concentração com efeito observável (LOEC — *Lowest Observed Effect Concentration*). Se o ensaio for negativo, a concentração mais elevada objeto de ensaio é referida como concentração sem efeitos observáveis (NOEC — *No Observed Effect Concentration*). As conclusões quanto à capacidade do produto químico de afetar a esteroidogénese devem basear-se em, pelo menos, dois ensaios independentes. O primeiro ensaio pode consistir num rastreio de gamas de concentração, procedendo-se ao ajustamento das concentrações nos dois ensaios posteriores, se pertinente, caso se registem problemas de solubilidade ou citotoxicidade ou se a atividade do produto químico se situar no limite da gama de concentrações de ensaio.

PROCEDIMENTO DE CULTURA CELULAR

Linhagem celular

14. As células NCI-H295R são comercializadas pela *American Type Culture Collections* (ATCC), mediante a assinatura de um contrato (*Material Transfer Agreement* — MTA) ([1]).

Introdução

15. Devido às alterações da capacidade de produção de E2 das células com a idade ou o número de passagens (2), as células devem ser cultivadas com base num protocolo específico antes de serem utilizadas, devendo registar-se o número de passagens desde o descongelamento das células, bem como o número da passagem na qual as mesmas são congeladas e armazenadas em azoto líquido. O primeiro número indica o número real da passagem; o segundo descreve o número da passagem na qual as células foram congeladas e armazenadas. Por exemplo, células que tenham sido congeladas após a passagem n.º 5, posteriormente descongeladas e divididas três vezes (quatro passagens, sendo a primeira constituída pelas células recém-descongeladas), sendo subsequentemente sujeitas a nova cultura, serão classificadas como células de passagem 4,5. O apêndice 1 do relatório de validação (4) apresenta um exemplo do sistema de numeração.

16. O meio de partida é utilizado como base para os meios suplementado e de congelamento. O meio suplementado é um componente necessário à cultura celular. O meio de congelamento destina-se especificamente a permitir o congelamento sem impacto nas células para armazenagem a longo prazo. Antes da utilização, deve analisar-se o*Nu-serum* (ou um soro semelhante com propriedades análogas, relativamente ao qual se tenha demonstrado que produz dados conformes com os requisitos de desempenho e controlo da qualidade do ensaio), componente do meio suplementado, para pesquisar concentrações de fundo de T e E2. A preparação destas soluções é descrita no apêndice II do relatório de validação (4).

([1]) ATCC CRL-2128; ATCC, Manassas, VA, USA, [http://www.lgcstandards-atcc.org/].

▼M5

17. Após o início da cultura de células H295R a partir de um lote ATCC original, as células devem ser sujeitas a cinco passagens (ou seja, quatro divisões). As células da passagem n.º 5 são então congeladas em azoto líquido, para armazenagem. Antes do congelamento, procede-se ao ensaio de uma amostra das células da passagem n.º 4 numa placa de controlo da qualidade (ver pontos 36 e 37), para verificar se a produção basal de hormonas e a resposta aos produtos químicos de controlo positivo cumprem os critérios de controlo da qualidade definidos no quadro 5.

18. Após a cultura, as células H295R têm de ser congeladas e armazenadas em azoto líquido, de forma a garantir que são sempre da passagem ou idade adequada à cultura e à utilização. O número máximo de passagens após a inoculação na cultura de um lote de células novo ([1]) ou congelado ([2]) aceitável para utilização no ensaio H295R não deve exceder 10. Por exemplo, o número aceitável de passagens em culturas de células a partir de um lote congelado na passagem n.º 5 estará compreendido entre 4,5 e 10,5. No caso das células colhidas de lotes congelados, deve seguir-se o procedimento descrito no ponto 19. Estas células devem ser cultivadas por, pelo menos, quatro passagens adicionais (passagem 4,5) antes de serem utilizadas no ensaio.

Preparação das células a partir do material congelado

19. Utiliza-se o procedimento de inoculação das células a partir do material congelado sempre que um novo lote de células é removido do azoto líquido para fins de cultura e ensaio. O procedimento pormenorizado encontra-se descrito no apêndice III do relatório de validação (4). As células são removidas do azoto líquido, descongeladas rapidamente e colocadas num meio suplementado, num tubo de centrifugadora, sendo centrifugadas à temperatura ambiente, ressuspendidas em meio suplementado e transferidas para um recipiente de cultura. O meio de cultura deve ser substituído no dia seguinte. As células H295R são cultivadas numa incubadora a 37 °C, em ar atmosférico com 5 % CO_2, sendo o meio renovado duas a três vezes por semana. Quando as células exibirem uma confluência de aproximadamente 85-90 %, devem ser divididas. A divisão é necessária para assegurar o bom estado e o crescimento das células e conservá-las até à realização dos bioensaios. As células são lavadas três vezes com uma solução-tampão salina de fosfatos (PBS, sem Ca^{2+} nem Mg^{2+}) e retiradas do recipiente de cultura através da adição de uma enzima de desprendimento adequada, por exemplo tripsina, dissolvida em PBS (sem Ca^{2+} nem Mg^{2+}). Imediatamente após a remoção das células do recipiente de cultura, deve suspender-se a ação da enzima através da adição de um meio suplementado na proporção de três vezes o volume utilizado no tratamento enzimático. As células são colocadas num tubo de centrifugadora e centrifugadas à temperatura ambiente; o sobrenadante é removido e o aglomerado de células ressuspendido no meio suplementado. Coloca-se no novo recipiente de cultura a quantidade adequada da solução com as células. A quantidade desta solução deve ser ajustada de forma que as células mostrem confluência num período de 5-7 dias. O rácio de subcultura recomendado é de 1:3 a 1:4. A placa deve ser rotulada cuidadosamente. As células ficam, assim, prontas para utilização no ensaio, devendo as células em excesso ser congeladas em azoto líquido do modo descrito no ponto 20.

([1]) A expressão «novo lote» refere-se a um novo lote de células recebidas do ATCC.

([2]) A expressão «lote congelado» referes-se a células anteriormente cultivadas e, de seguida, congeladas num laboratório diverso do ATCC.

▼M5

Congelamento das células H295R (preparação para armazenamento em azoto líquido)

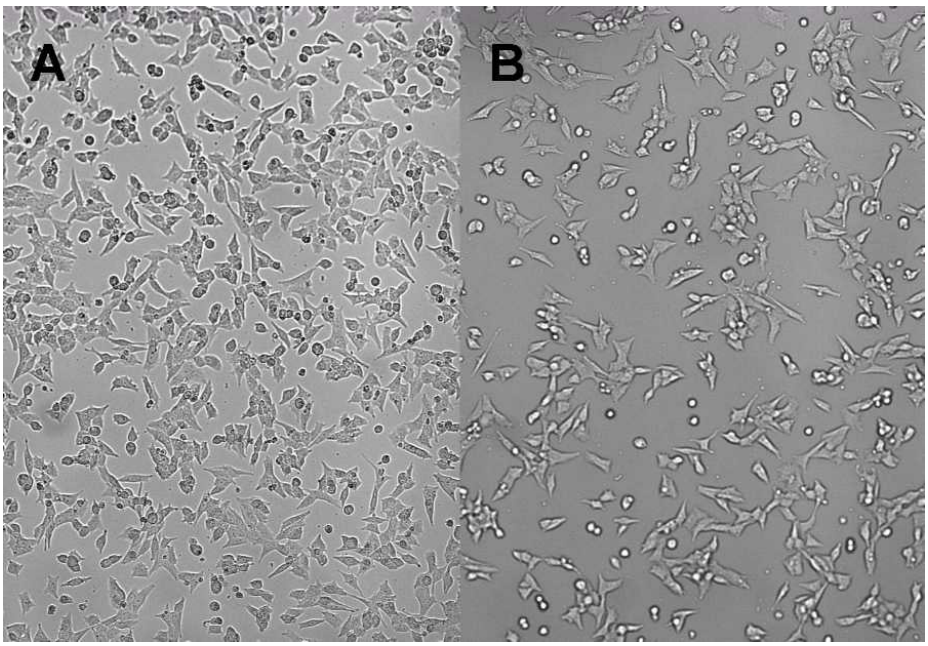
20. Para preparar as células H295R para congelamento, deve seguir-se o procedimento atrás descrito para a divisão das mesmas, até à etapa de ressuspensão do aglomerado de células presentes no fundo do tubo de centrifugadora, que é efetuada em meio de congelamento. A solução é transferida para um balão criogénico devidamente rotulado e congelada a –80°C durante 24 horas, período após o qual o balão criogénico é transferido para o recipiente com azoto líquido, para armazenagem. O apêndice III do relatório de validação (4) contém os pormenores do procedimento a seguir.

Preparação das placas e pré-incubação das células para ensaio

21. O número necessário de placas de 24 alvéolos, preparadas do modo descrito no ponto 19, depende do número de produtos químicos a ensaiar, bem como da confluência das células nos recipientes de cultura. Em geral, um recipiente de cultura (75 cm^2) com 80-90 % de células confluentes fornece um número de células suficiente para 1 a 1,5 placas de 24 alvéolos, à densidade-alvo de 200 000 a 300 000 células por ml de meio, resultando numa confluência de, aproximadamente, 50-60 % nos alvéolos em 24 horas (figura 2). Esta é, normalmente, a densidade celular ótima para a produção de hormonas no ensaio. A densidades mais elevadas, são alterados os perfis de produção de T e de E2. Antes de realizar o ensaio pela primeira vez, recomenda-se que sejam ensaiadas várias densidades de inoculação compreendidas entre 200 000 e 300 000 células por ml, devendo selecionar-se para os ensaios posteriores a densidade que determine uma confluência de 50-60 % nos alvéolos em 24 horas.

Figura 2

Fotomicrografia de células H295R à densidade de inoculação de 50 %, numa placa de cultura de 24 alvéolos, às 24 horas, no bordo (A) e no centro (B) de um alvéolo



22. O meio é removido com uma pipeta do recipiente de cultura, sendo as células lavadas três vezes com PBS estéril (sem Ca^{2+} nem Mg^{2+}). Para desprender as células do recipiente de cultura, adiciona-se uma solução de enzima em PBS. Após um período adequado ao desprendimento das células, suspende-se a ação enzimática através da adição de meio suplementado à razão de três vezes o volume utilizado no tratamento enzimático. Colocam-se as células num tubo de centrifugadora e centrifuga-se à temperatura ambiente; seguidamente, remove-se o sobrenadante e ressuspende-se o aglomerado de células em meio suplementado. Calcula-se a densidade

▼M5

celular, utilizando, p.ex. um hemocitómetro ou um contador celular. A solução com as células deve ser diluída para a densidade pretendida na placa e homogeneizada de forma a garantir uma densidade celular homogénea. As células são colocadas na placa com 1 ml de solução por alvéolo, devendo rotular-se as placas e os alvéolos. As placas inoculadas são incubadas durante 24 horas a 37 °C, em ar atmosférico com 5 % de CO_2, de forma a permitir a aderência das células aos alvéolos.

REQUISITOS DE CONTROLO DA QUALIDADE

23. Durante a dosagem, é indispensável que sejam colocados nos alvéolos volumes exatos das soluções e amostras, dado que esses volumes determinam as concentrações utilizadas no cálculo dos resultados.

24. Antes do início da cultura celular e de qualquer ensaio posterior, cada laboratório deve demonstrar a sensibilidade do seu sistema de determinação das hormonas (pontos 29-31).

25. Caso se utilizem métodos de determinação de hormonas baseados em anticorpos, deve averiguar-se, antes de iniciar o ensaio, o potencial de interferência dos produtos químicos a ensaiar com o sistema de medida utilizado para quantificar a T e a E2, como referido no ponto 32.

26. O DMSO é o solvente recomendado para o ensaio. Caso se utilize um solvente alternativo, devem determinar-se os seguintes parâmetros:

— Solubilidade do produto químico em estudo, da forskolina e do procloraz no solvente; e

— Citotoxicidade em função da concentração do solvente.

Recomenda-se que a concentração máxima permissível do solvente não exceda uma diluição de 10 vezes a concentração menos citotóxica do solvente.

27. Antes de realizar o ensaio pela primeira vez, o laboratório deve realizar um ensaio de qualificação que demonstre a sua capacidade de adotar e manter as condições de cultura celular e condições experimentais adequadas ao ensaio do produto químico em conformidade com os pontos 33-35.

28. Deve realizar-se um ensaio de controlo, como descrito nos pontos 36 e 37, antes da utilização de um novo lote de células, com vista a avaliar o desempenho das mesmas.

Desempenho do sistema de determinação das hormonas

Sensibilidade, exatidão e precisão do método; reatividade cruzada com a matriz da amostra

29. Para a análise da T e da E2 produzidas pelas células H295R, cada laboratório pode utilizar um sistema de determinação de hormonas da sua escolha, desde que o mesmo satisfaça os critérios de desempenho, nomeadamente os limites de quantificação (LOQ). Estes são, geralmente, de 100 pg/ml no caso da testosterona e de 10 pg/ml no caso da E2, valores que se baseiam nos níveis de hormonas basais observados nos estudos de validação. Podem, contudo, justificar-se níveis mais elevados ou mais baixos, em função dos níveis basais de hormonas obtidos no laboratório em causa. Antes de iniciar a verificação do controlo da qualidade e os ensaios, o laboratório deve demonstrar que o método a utilizar na determinação das hormonas permite medir as respetivas concentrações no meio suplementado com exatidão e precisão suficientes para o cumprimento dos critérios de controlo de qualidade especificados nos quadros 1 e 5, analisando o meio suplementado enriquecido com hormona (controlo interno). O meio suplementado é enriquecido com, pelo menos, três concentrações de cada hormona (*p.ex.* 100, 500 e 2 500 pg/ml de T; 10, 50 e 250 pg/ml de E2; em alternativa, podem

▼M5

utilizar-se as concentrações mais baixas possíveis em função dos limites de deteção do sistema de determinação escolhido para as concentrações enriquecidas mais baixas para a T e a E2) e, seguidamente, analisado. As concentrações de hormonas determinadas nas amostras não extraídas não devem divergir em mais de 30 % das concentrações nominais e a variação entre determinações replicadas da mesma amostra não deve exceder 25 % (o quadro 8 contém critérios adicionais de controlo da qualidade). Caso estes critérios sejam satisfeitos, considera-se que o método de determinação das hormonas é suficientemente exato e preciso, não se prevendo a ocorrência de reações cruzadas com os componentes do meio (matriz da amostra) que possam influir de forma significativa nos resultados. Nesse caso, não é necessário proceder à extração das amostras antes da determinação das hormonas.

30. Se não forem satisfeitos os critérios de controlo da qualidade constantes dos quadros 1 e 8, pode estar a ocorrer um efeito matricial significativo, devendo realizar-se um ensaio com meio enriquecido extraído. O apêndice II do relatório de validação (4) apresenta um exemplo do procedimento de extração. A determinação das concentrações de hormonas nas amostras extraídas deve efetuar-se em triplicado ([1]). Se, após a extração, for possível demonstrar que os componentes do meio não interferem com o método de deteção das hormonas definido pelos critérios de controlo da qualidade, todos os ensaios subsequentes devem ser realizados com amostras extraídas. Se os critérios de controlo da qualidade não forem cumpridos após a extração, o sistema de determinação das hormonas utilizado não é adequado para os fins do ensaio de esteroidogénese H295R, devendo recorrer-se a um método alternativo.

Curva-padrão

31. As concentrações de hormonas nos controlos com solvente devem situar-se no troço linear da curva-padrão, devendo, preferencialmente, ser próximas do valor correspondente ao ponto médio do referido troço, para que se possa determinar a indução ou a inibição da síntese das hormonas. As diluições do meio (ou dos extratos) a determinar devem ser selecionadas em conformidade. A relação linear deve ser definida por um método estatístico adequado.

Ensaio de determinação da interferência de produtos químicos

32. Se, para a determinação das hormonas, forem utilizados ensaios baseados em anticorpos, como ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA) e ensaios radioimunológicos (RIA), deve averiguar-se a possível interferência de cada um dos produtos químicos em estudo com o sistema de determinação de hormonas a utilizar, antes do início do ensaio do produto em causa [apêndice III do relatório de validação (4)], dado que alguns produtos químicos podem interferir com os processos de ensaio (17). Caso a análise demonstre uma interferência traduzida num aumento da produção de T e/ou E2 ≥ 20 % relativamente à produção basal destas hormonas, deve efetuar-se um ensaio de interferência dos produtos químicos na determinação das hormonas (do tipo descrito no apêndice III do relatório de validação (4), secção 5.0) com todas as diluições do produto químico em estudo, para identificar a dose-limiar à qual ocorre uma interferência significativa (≥ 20 %). Se a interferência for inferior a 30 %, os resultados podem ser

([1]) *Nota:* Se a extração for necessária, devem efetuar-se três medições em replicado para cada extrato. Cada amostra deve ser extraída apenas uma vez.

▼M5

corrigidos em conformidade. Se exceder 30 %, os dados não são válidos, devendo as concentrações em causa ser eliminadas do estudo. Se ocorrer uma interferência significativa da substância em estudo com o sistema de determinação das hormonas a mais de uma concentração não citotóxica, deve utilizar-se outro sistema de determinação. Para evitar interferências de produtos químicos contaminantes, recomenda-se que as hormonas sejam extraídas do meio por recurso a solventes adequados; o relatório de validação descreve métodos possíveis para esse efeito (4).

Quadro 1

Critérios de desempenho para os sistemas de determinação de hormonas

Parâmetro	Critério
Sensibilidade do método de determinação	Limite de quantificação (LOQ) T: 100 pg/ml; E2: 10 pg/ml [a]
Eficiência de extração das hormonas (apenas se esta for necessária)	As taxas médias de recuperação (com base em determinações em triplicado) para as quantidades de hormonas adicionadas não devem exibir um desvio superior a 30 % da quantidade adicionada.
Interferência química (apenas para sistemas baseados em anticorpos)	Não deve registar-se uma reatividade cruzada substancial (≥ 30 % da produção basal da hormona em causa) com nenhuma das hormonas produzidas pelas células [b] [c]

[a] *Nota:* Os limites de determinação do método derivam dos valores de produção basal de hormonas constantes do quadro 5 e baseiam-se no desempenho. Os limites podem ser superiores se a produção basal de hormonas for superior.

[b] A percentagens superiores, alguns anticorpos da T e da E2 podem reagir de forma cruzada com a androstenodiona e a estrona, respetivamente. Nessas condições, não é possível determinar com exatidão os efeitos na 17β-HSD. Apesar disso, os dados podem proporcionar informações úteis sobre os efeitos na produção de estrogénios ou androgénios em geral. Nesses casos, os dados devem ser expressos em androgénios/estrogénios produzidos, em vez de E2 e T.

[c] Designadamente: colesterol, pregnenolona, progesterona, 11-desoxicorticosterona, corticosterona, aldosterona, 17α-pregnenolona,17α-progesterona, desoxicortisol, cortisol, DHEA, androstenodiona, estrona.

Ensaio de proficiência laboratorial

33. Antes de ensaiar produtos químicos desconhecidos, um laboratório deve demonstrar, por recurso ao ensaio de proficiência laboratorial, a sua capacidade de adotar e manter as condições de cultura celular e condições experimentais adequadas à boa realização do ensaio. Dado que o desempenho de um ensaio está diretamente ligado ao pessoal do laboratório que o realiza, o procedimento deve ser parcialmente repetido caso ocorram mudanças no pessoal.

34. O ensaio de proficiência deve ser realizado nas condições descritas nos pontos 38 a 40, expondo células a sete concentrações crescentes de indutores e inibidores fortes, moderados e ligeiros, bem como a um produto químico negativo (ver quadro 2). Especificamente, os produtos químicos a ensaiar incluem o indutor forte forskolina (n.º CAS 66575-29-9); o inibidor forte procloraz (n.º CAS 67747-09-5); o indutor moderado atrazina (n.º CAS 1912-24-9); o inibidor moderado aminoglutetimida (n.º CAS 125-84-8); o indutor fraco (produção de E2) e o inibidor fraco (produção de T) bisfenol A (n.º CAS 80-05-7), bem como o produto químico negativo gonadotrofina coriónica humana (HCG) (n.º CAS 9002-61-3), como se

▼M5

ilustra no quadro 2. Utilizam-se placas distintas para cada produto químico, de acordo com o modelo que se ilustra no quadro 6. Cada ensaio diário dos produtos químicos para o esnaio de proficiência deve incluir uma placa de controlo da qualidade (quadro 4, pontos 36-37).

Quadro 2

Produtos químicos para o ensaio de proficiência e concentrações de exposição

Produto químico	Concentrações de ensaio [μM]
Procloraz	0 (a), 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10
Forskolina	0 (a), 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30
Atrazina	0 (a), 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100
Aminoglutetimida	0 (a), 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100
Bisfenol A	0 (a), 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100
HCG	0 (a), 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100

(a) Controlo com solvente (DMSO) (0), 1 μl DMSO/alvéolo.

No ensaio de proficiência laboratorial, a exposição das células H295R aos produtos químicos é efetuada em placas de 24 alvéolos. A dosagem é expressa em μM no respeitante a todas as doses de produtos químicos em estudo. As doses devem ser administradas em DMSO a 0,1 % (v/v) por alvéolo. Todas as concentrações de ensaio devem ser ensaiadas em triplicado (quadro 6). Utilizam-se placas distintas para cada produto químico. Cada série de ensaios diária deve incluir uma placa de controlo da qualidade.

35. As análises da viabilidade celular e das hormonas devem ser efetuadas do modo descrito nos pontos 42 a 46. O valor-limiar (menor concentração com efeito observável, LOEC) e a decisão de classificação devem ser comunicados e comparados com os valores constantes do quadro 3. Os dados são considerados aceitáveis se forem conformes com o LOEC e a decisão de classificação constantes do quadro 3.

Quadro 3

Valores-limiar (LOEC) e decisões de classificação respeitantes aos produtos químicos para o ensaio de proficiência

	N.º CAS	LOEC [μM]		Decisão de classificação	
		T	E2	T	E2
Procloraz	67747-09-5	≤ 0,1	≤ 1,0	+ (a) (Inibição)	+ (Inibição)
Forskolina	66575-29-9	≤ 10	≤ 0,1	+ (Indução)	+ (Indução)
Atrazina	1912-24-9	≤ 100	≤ 10	+ (Indução)	+ (Indução)
Aminogluteti-mida	125-84-8	≤ 100	≤ 100	+ (Inibição)	+ (Inibição)

▼M5

	N.º CAS	LOEC [μM]		Decisão de classificação	
		T	E2	T	E2
Bisfenol A	80-05-7	≤ 10	≤ 10	+ (Inibição)	+ (Indução)
HCG	9002-61-3	n/a	n/a	Negativo	Negativo

([a]) +, positivo
n/a: não aplicável, dado que não deverão ocorrer alterações após a exposição a concentrações não citotóxicas do controlo negativo.

Placa de controlo da qualidade

36. A placa de controlo da qualidade é utilizada para verificar o desempenho das células H295R em condições de cultura normalizadas, bem como para criar uma base de dados históricos de concentrações das hormonas nos solventes de controlo, nos controlos positivos e negativos e nos outros ensaios de controlo da qualidade que forem sendo efetuados.

— O desempenho das células H295R deve ser avaliado por recurso a uma placa de controlo da qualidade para cada novo lote ATCC, ou após a utilização, pela primeira vez, de um lote de células previamente congeladas, exceto se tiver sido realizado um ensaio de proficiência laboratorial (pontos 32-34) com esse lote de células.

— A placa de controlo da qualidade proporciona uma avaliação completa das condições de ensaio de produtos químicos (*p.ex.* viabilidade celular, controlos com solvente, controlos negativos e positivos, variabilidade intra e interensaios), devendo constituir parte integrante de cada ensaio.

37. O ensaio de controlo da qualidade é realizado numa placa de 24 alvéolos, seguindo os mesmos procedimentos em matéria de incubação, dosagem, viabilidade celular/citotoxicidade, extração e análise das hormonas descritos nos pontos 38 a 46 para o ensaio dos produtos químicos. A placa de controlo da qualidade contém brancos, controlos com solvente e duas concentrações de um indutor (forskolina, 1, 10 μM) e de um inibidor (procloraz, 0,1, 1 μM) conhecido da síntese de E2 e T. Utiliza-se também, em alguns alvéolos, MeOH (controlo positivo do ensaio de viabilidade celular/ /citotoxicidade). O quadro 4 apresenta uma descrição pormenorizada da configuração da placa. Os critérios que esta deve satisfazer são enumerados no quadro 5. Tanto no controlo com solvente como nos alvéolos em branco deve observar-se a produção basal mínima de hormonas (T e E2).

Quadro 4

Configuração da placa de controlo da qualidade para o ensaio do desempenho de células H295R não expostas e de células expostas a inibidores (PRO = procloraz) e promotores (FOR = forskolina) conhecidos da produção de E2 e T. Após o termo da exposição e a remoção do meio, adiciona-se uma solução de metanol a 70 % a todos os alvéolos com MeOH, que servirá de controlo positivo da citotoxicidade [ver o ensaio de citotoxicidade no apêndice III do relatório de validação (4)]

	1	2	3	4	5	6
A	Branco ([a])	Branco ([a])	Branco ([a])	Branco ([a]) (+ MeOH) ([b])	Branco ([a]) (+ MeOH) ([b])	Branco ([a]) (+ MeOH) ([b])
B	DMSO ([c]) 1 μl	DMSO ([c]) 1 μl	DMSO ([c]) 1 μl	DMSO ([c]) 1 μl (+ MeOH) ([b])	DMSO ([c]) 1 μl (+ MeOH) ([b])	DMSO ([c]) 1 μl (+ MeOH) ([b])

▼M5

	1	2	3	4	5	6
C	FOR 1 μM	FOR 1 μM	FOR 1 μM	PRO 0,1 μM	PRO 0,1 μM	PRO 0,1 μM
D	FOR 10 μM	FOR 10 μM	FOR 10 μM	PRO 1 μM	PRO 1 μM	PRO 1 μM

([a]) As células nos alvéolos correspondentes ao branco recebem apenas meio (sem solvente).
([b]) O metanol (MeOH) é adicionado após o termo da exposição, sendo o meio removido dos alvéolos.
([c]) Controlo com solvente DMSO (1 μl/alvéolo).

Quadro 5

Critérios de desempenho para a placa de controlo da qualidade

	T	E2
Produção basal de hormonas no controlo com solvente (CS)	≥ 5 × LOQ	≥ 2,5 × LOQ
Indução (10 μM forskolina)	≥ 1,5 × CS	≥ 7,5 × CS
Inibição (1μM procloraz)	≤ 0,5 × CS	≤ 0,5 × CS

PROCEDIMENTO DE ExposIÇÃO AOS PRODUTOS QUÍMICOS

38. As células pré-incubadas são tiradas da incubadora (ponto 21) e observadas ao microscópio, para assegurar que se encontram em boas condições (aderência, morfologia), antes da dosagem.

39. As células são colocadas num espaço confinado biosseguro, sendo o meio suplementado removido e substituído por um novo meio suplementado (1 ml/alvéolo). O DMSO é o solvente preferido neste método de ensaio. Contudo, se existirem motivos para utilizar outros solventes, deve apresentar-se a respetiva fundamentação científica. As células são expostas ao produto químico em estudo através da adição de 1 μl da solução-mãe adequada em DMSO [ver apêndice II do relatório de validação (4)] por mililitro de meio suplementado (volume do alvéolo). A concentração final de DMSO nos alvéolos será, assim, de 0,1 %. Para assegurar a homogeneização, é geralmente preferível que a solução-mãe adequada do produto químico em estudo em DMSO seja misturada com meio suplementado de forma a produzir a concentração final pretendida para cada dose, sendo a mistura resultante adicionada em cada alvéolo imediatamente após a remoção do meio anterior. Se se utilizar esta opção, a concentração de DMSO (0,1 %) deverá ser a mesma em todos os alvéolos. Os alvéolos que contenham as duas concentrações mais elevadas são inspecionados visualmente, por recurso a um estereomicroscópio, para averiguar a eventual formação de precipitados ou turbidez, que constituem indicações de uma solubilização incompleta do produto químico em estudo. Caso se observem essas condições (turbidez, formação de precipitados), os alvéolos que contêm as concentrações inferiores (e assim sucessivamente) são também examinados; as concentrações que não tenham conduzido a uma dissolução completa são excluídas da avaliação e análise complementar. Recoloca-se a placa na incubadora a 37 °C, com ar atmosférico com 5 % de CO_2, durante 48 horas. O quadro 6 ilustra a configuração da placa com a substância em estudo. Os lotes 1-7 mostram a distribuição na placa das doses crescentes de produto químico em estudo.

▼M5

Quadro 6

Esquema de dosagem para a exposição de células H295R a produtos químicos em estudo, numa placa de 24 alvéolos

	1	2	3	4	5	6
A	DMSO	DMSO	DMSO	Lote 4	Lote 4	Lote 4
B	Lote 1	Lote 1	Lote 1	Lote 5	Lote 5	Lote 5
C	Lote 2	Lote 2	Lote 2	Lote 6	Lote 6	Lote 6
D	Lote 3	Lote 3	Lote 3	Lote 7	Lote 7	Lote 7

40. Após 48 horas, as placas são removidas da incubadora, sendo cada alvéolo sujeito à inspeção microscópica com vista a determinar o estado das células (aderência, morfologia, grau de confluência) e quaisquer sinais de citotoxicidade. O meio presente em cada alvéolo é dividido em duas porções iguais, de aproximadamente 490 µl, e transferido para dois recipientes devidamente rotulados (uma das alíquotas constitui uma amostra de reserva para cada alvéolo). Para evitar a secagem das células, o meio é removido por filas ou colunas e substituído com o meio para o ensaio de viabilidade celular/citotoxicidade. Se a viabilidade celular ou citotoxicidade não for determinada de imediato, adiciona-se a cada alvéolo 200 µl de PBS com Ca^{2+} e Mg^{2+}. Os meios são congelados a – 80 °C até se proceder à análise das concentrações de hormonas (ver pontos 44-46). Embora, num meio mantido a – 80 °C, a T e a E2 se mantenham, em geral, estáveis por, pelo menos, três meses, cada laboratório deve documentar a estabilidade das hormonas durante a armazenagem.

41. A viabilidade celular/citotoxicidade em cada placa é determinada imediatamente após a remoção do meio.

Determinação da viabilidade celular

42. Para determinar o impacto potencial do produto químico em estudo, pode utilizar-se um ensaio de viabilidade celular/citotoxicidade da escolha do laboratório. O ensaio deve ter capacidade para proporcionar uma medição correta da percentagem de células viáveis presentes num alvéolo; em alternativa, deve demonstrar-se a sua comparabilidade direta (expressa numa função linear) com o ensaio Live/Dead® [ver o apêndice III do relatório de validação (4)]. Um ensaio alternativo que se verificou funcionar bem é o ensaio com MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] (18). A avaliação da viabilidade celular por recurso aos referidos métodos constitui uma medida relativa que não apresenta necessariamente uma relação linear com o número absoluto de células num alvéolo. O analista deve, pois, efetuar, em paralelo, um exame visual subjetivo de cada alvéolo, devendo também, se necessário, obter e arquivar imagens digitais dos controlos com solvente (SC — *Solvent Controls*) e das duas concentrações não citotóxicas mais elevadas, para permitir a avaliação posterior da densidade celular real. Se a inspeção visual mostrar, ou o ensaio de viabilidade celular/ /citotoxicidade demonstrar, um aumento aparente do número de células, é necessário verificá-lo. Se esse aumento for comprovado, o facto deve constar do relatório do ensaio. A viabilidade celular é expressa em relação à resposta média nos SC (100 % de células viáveis), e é calculada por um método adequado ao ensaio de viabilidade celular/citotoxicidade em causa. No caso do ensaio com MTT, pode utilizar-se a seguinte fórmula:

▼M5

% células viáveis = (resposta no alvéolo – resposta média nos alvéolos tratados com MeOH [= 100 % células mortas]) – (resposta média nos alvéolos SC – resposta média nos alvéolos tratados com MeOH [= 100 % células mortas)

43. Os alvéolos cuja viabilidade celular seja inferior a 80 % relativamente à viabilidade média nos SC (= 100 %) não devem ser incluídos na análise final dos dados. A inibição da esteroidogénese que se observa em cerca de 20 % dos casos de citotoxicidade deve ser cuidadosamente avaliada, de forma a garantir que a citotoxicidade não constitui a causa da inibição.

Análise das hormonas

44. Para a análise da T e da E2, cada laboratório pode utilizar um sistema de determinação de hormonas da sua escolha. Podem utilizar-se alíquotas de reserva do meio de cada grupo de tratamento para preparar diluições destinadas a obter uma concentração no troço linear da curva-padrão. Como referido no ponto 29, cada laboratório deve demonstrar a conformidade do sistema de determinação de hormonas que utilizar (*p.ex.* ELISA, RIA, LC-MS, LC-MS/MS) com os critérios de controlo da qualidade, analisando, para o efeito, meio suplementado enriquecido com um controlo interno de hormona, antes de efetuar os ensaios de controlo da qualidade ou de analisar os produtos químicos. Para garantir que as componentes do sistema de ensaio não interferem com a determinação das hormonas, estas podem ter de ser extraídas do meio antes da análise (as condições nas quais a extração é ou não necessária são descritas no ponto 30). Recomenda-se que a extração seja efetuada de acordo com os procedimentos descritos no apêndice III do relatório de validação (4).

45. Se for utilizado um conjunto de ensaio comercial para medir a produção de hormonas, a análise deve ser efetuada do modo especificado nos manuais de instruções fornecidos pelo fabricante. A maioria dos fabricantes tem um procedimento único para a realização das análises hormonais. As diluições das amostras têm de ser ajustadas para que as concentrações de hormonas previstas nos controlos com solvente se situem na zona média do troço linear da curva-padrão do ensaio individual [apêndice III do relatório de validação (4)]. Os valores que se situem fora do referido troço linear devem ser rejeitados.

46. As concentrações finais das hormonas são calculadas do seguinte modo:

Exemplo:

Quantidade extraída:	450 µl de meio
Reconstituição em:	250 µl de tampão
Diluição no ensaio:	1:10 (para situar a amostra no troço linear da curva-padrão)
Concentração de hormonas obtida no ensaio:	150 pg/ml (já ajustada à concentração por ml de amostra utilizada no ensaio)
Recuperação:	89 %
Concentração final de hormonas =	(Concentração de hormonas (por ml) ÷ recuperação) (fator de diluição)
Concentração final de hormonas =	(150 pg/ml) ÷ (0,89) × (250 µl/450 µl) × 10 = 936,3 pg/ml

▼M5

Seleção das concentrações de ensaio

47. Devem efetuar-se, no mínimo, duas séries independentes de ensaios. Exceto se existirem informações, nomeadamente sobre os limites de solubilidade ou a citotoxicidade, que permitam selecionar as concentrações de ensaio, recomenda-se que as concentrações do ensaio inicial sejam espaçadas por fatores de $\log_{10}$, sendo 10^{-3} M a concentração máxima. Se o produto químico for solúvel e não citotóxico a qualquer das concentrações ensaiadas e a primeira série de ensaios produzir resultados negativos para todas as concentrações, há que proceder a uma confirmação com uma nova série de ensaios, utilizando as mesmas condições que na primeira série (quadro 7). Se os resultados da primeira série de ensaios forem *equívocos* (ou seja, o fator de alteração em relação ao SC for estatisticamente significativa apenas a uma concentração) ou positivos (ou seja, o fator de alteração entre duas ou mais concentrações adjacentes for estatisticamente significativo), o ensaio deve ser repetido da forma indicada no quadro 7, refinando as concentrações de ensaio selecionadas. As concentrações de ensaio na segunda e terceira séries (se for caso disso) devem ser ajustadas com base nos resultados das concentrações da série de ensaios inicial que produziram um efeito, utilizando intervalos de concentração semilogarítmicos (p. ex., se, na série original de 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10, 100, 1 000 μM se observaram induções a 1 e 10 μM, as concentrações ensaiadas na segunda série devem ser de 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30 e 100 μM), exceto se tiverem de ser utilizadas concentrações mais baixas para atingir uma LOEC. Neste caso, devem utilizar-se na segunda série de ensaios, pelo menos, cinco concentrações inferiores à concentração mais baixa ensaiada na primeira série, de acordo com uma escala semilogarítmica. Se os resultados da segunda série de ensaios não confirmarem os da primeira (isto é, se não ocorrer significância estatística à concentração com resultados positivos no ensaio anterior ± 1 incremento de concentração), é necessário efetuar uma terceira série de ensaios utilizando as condições originais. Os resultados equívocos da primeira série consideram-se negativos se o efeito observado não puder ser confirmado em nenhuma das séries de ensaios subsequentes. Os resultados equívocos são considerados respostas positivas (efeito) se for possível confirmar a resposta em, pelo menos, uma série de ensaios complementar com um incremento de concentração de ± 1 (ver o ponto 55 do procedimento para a interpretação dos dados).

Quadro 7

Matriz de decisões para possíveis cenários de resultados

Série 1	Série 2		Série 3		Decisão	
Cenário	Decisão	Cenário	Decisão	Cenário	Positivo	Negativo
Negativo	Confirmar ([a])	Negativo	Parar			X
Negativo	Confirmar ([a])	Positivo	Refinar ([b])	Negativo		X
Equívoco ([c])	Refinar ([b])	Negativo	Confirmar ([a])	Negativo		X
Equívoco ([c])	Refinar ([b])	Negativo	Confirmar ([a])	Positivo	X	
Equívoco ([c])	Refinar ([b])	Positivo			X	
Positivo	Refinar ([b])	Negativo	Confirmar ([a])	Positivo	X	

▼M5

Série 1	Série 2		Série 3		Decisão	
Cenário	Decisão	Cenário	Decisão	Cenário	Positivo	Negativo
Negativo	Confirmar (a)	Positivo	Refinar (b)	Positivo	X	
Positivo	Refinar (b)	Positivo	Parar		X	

(a) Confirmar o ensaio anterior utilizando as mesmas condições experimentais.
(b) Reefetuar o ensaio com intervalos de concentração semilogarítmicos (em torno da concentração que produziu resultados significativamente diferentes no ensaio anterior).
(c) Estatisticamente, a uma dada concentração, o fator multiplicador é significativamente diferente do SC

Controlo de qualidade da placa de ensaio

48. Além dos critérios aplicáveis à placa de controlo da qualidade, apresentam-se no quadro 8 outros critérios de qualidade que devem ser cumpridos, respeitantes, designadamente, à variação aceitável entre alvéolos replicados, ensaios replicados, linearidade e sensibilidade dos sistemas de determinação de hormonas, variabilidade entre as determinações replicadas de hormonas na mesma amostra e percentagem de recuperação das amostras enriquecidas em hormonas após a extração do meio (se pertinente — ver o ponto 30 para os requisitos em matéria de extração). Para serem tidos em conta na avaliação posterior, os dados devem situar-se nas gamas aceitáveis definidas para cada parâmetro. Se isso não suceder, deve assinalar-se que os critérios de controlo da qualidade não foram cumpridos no caso da amostra em questão, devendo a mesma ser reanalisada ou eliminada do conjunto de dados.

Quadro 8

Gamas e/ou variação (%) aceitáveis para os parâmetros da placa do ensaio H295R.

(LOQ: Limite de quantificação do sistema de determinação de hormonas. CV: Coeficiente de variação; SC: Controlo com solvente; DPM: Desintegrações por minuto)

	Comparação	T	E2
Produção basal de hormonas nos SC	Fator multiplicador em relação à LOQ	≥ 5 vezes	≥ 2,5 vezes
Ensaios de exposição — CV para os SC intraplacas (alvéolos replicados)	Concentrações absolutas	≤ 30 %	≤ 30 %
Ensaios de exposição — CV para os SC interplacas (ensaios replicados)	Fator multiplicador	≤ 30 %	≤ 30 %
Sistema de determinação das hormonas –Sensibilidade	Fator de redução detetável em relação ao SC	≥ 5 vezes	≥ 2,5 vezes
Sistema de determinação das hormonas — determinações replicadas de CV para os SC (a)	Concentrações absolutas	≤ 25 %	≤ 25 %
Extração do meio — Recuperação do padrão interno 3H (se pertinente)	DPM	≥ 65 % Nominal	

(a) Refere-se a determinações replicadas da mesma amostra.

▼M5

ANÁLISE E APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

Análise dos dados

49. Para avaliar o aumento/decréscimo relativos da produção de hormona induzidos pelos produtos químicos, os resultados devem ser normalizados em relação ao valor médio de SC de cada placa de ensaio, sendo os resultados expressos em alterações relativamente ao SC em cada placa. Todos os dados devem ser expressos em média ± 1 desvio-padrão (SD).

50. A análise dos dados deve apenas abranger dados relativos às hormonas dos alvéolos nos quais se observou uma citotoxicidade inferior a 20 %. As alterações relativas são calculadas do seguinte modo:

Alteração relativa = (Concentração de hormonas em cada alvéolo) ÷ (Concentração média de hormonas em todos os alvéolos de controlo com solvente).

51. Se a inspeção visual do alvéolo ou o ensaio de viabilidade/citotoxicidade descrito no ponto 42 indiciarem um aumento do número de células, este aumento aparente deve ser verificado. Caso se confirme, o facto deve ser referido no relatório de ensaio.

52. Antes de proceder às análises estatísticas, importa avaliar os pressupostos de normalidade e homogeneidade das variâncias. A normalidade deve ser avaliada por recurso a gráficos de probabilidade-padrão ou por outro método estatístico adequado (*p.ex.* ensaio de Shapiro-Wilk). Se os dados (fatores de alteração) não apresentarem uma distribuição normal, deve procurar-se transformá-los para que se aproximem da mesma. Se os dados apresentarem uma distribuição normal ou próxima desta, devem analisar-se as diferenças entre os grupos sujeitos a concentrações do produto químico e os SC, por recurso a um ensaio paramétrico (p. ex., ensaio de Dunnett), tomando a *concentração* como variável independente e a *resposta* (fator de alteração) como variável dependente. Se os dados não apresentarem uma distribuição normal, deve utilizar-se um ensaio não paramétrico adequado (p. ex., ensaio de Kruskal-Wallis ou ensaio de Steel). Consideram-se as diferenças significativas se $p \leq 0,05$. As avaliações estatísticas são efetuadas com base nos valores médios dos alvéolos que representam dados replicados independentes. Devido ao grande intervalo entre as doses na primeira série de ensaios (escala de $\log_{10}$), prevê-se que, em muitos casos, não seja possível definir claramente relações concentração-resposta se as duas doses mais elevadas se situarem no troço linear da curva sigmóide. Assim, no caso dos dados da primeira série de ensaios ou de qualquer outra série de dados em que tal ocorra (p.ex., se não puder ser estimada a eficácia máxima), aplicam-se estatísticas de variável fixa do tipo I, da forma atrás descrita.

53. Se, pelo menos, dois pontos se situarem no troço linear da curva e puderem ser calculadas as eficácias máximas — como se prevê no caso de alguns ensaios da 2ª série efetuados utilizando intervalos semilogarítmicos entre as concentrações de exposição — a devem utilizar-se métodos *probit*, *logit* ou outros modelos adequados de regressão linear (p. ex., EC50 e EC20) para o cálculo das concentrações efetivas.

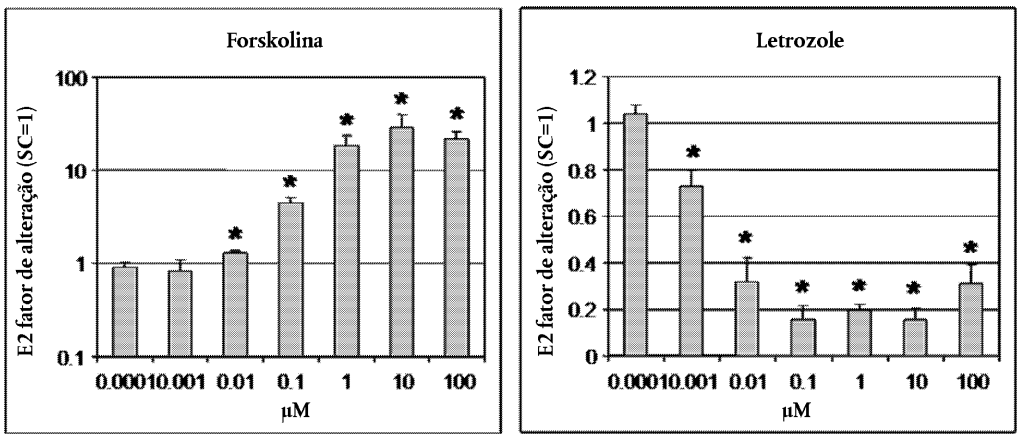
54. Os resultados devem ser apresentados em forma gráfica (gráfico de barras representando a média ± 1 desvio-padrão) e tabular (LOEC/NOEC, tipo de efeito e intensidade da resposta máxima na componente dose-resposta dos dados) (a figura 3 apresenta um exemplo). A avaliação dos dados apenas se considera válida se for baseada em, pelo menos, duas séries de ensaios independentes. Um ensaio, ou série de ensaios, é considerado independente se tiver sido efetuado numa data diferente, utilizando uma nova série de soluções e de controlos. A gama de concentrações utilizada nas séries de ensaios 2 e 3 (se necessário) pode ser adaptada com base nos resultados da série 1, de forma a definir melhor a gama de respostas que abrange a LOEC (ver ponto 47).

▼M5

Figura 3

Exemplo de apresentação e avaliação de dados obtidos com a execução do ensaio H295R, em forma gráfica e tabular

[Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo com solvente ($p < 0,05$). LOEC: Menor concentração com efeito observável; Alteração máx: Intensidade máxima da resposta observada a qualquer concentração relativamente à resposta média do SC (= 1)]



Produto químico	LOEC	Alteração máx.
Forskolina	0,01	0,15 vezes
Letrozole	0,001	29 vezes

Procedimento de interpretação dos dados

55. Um produto químico é considerado positivo se o fator multiplicativo de indução for estatisticamente diferente ($p \leq 0,05$) entre duas concentrações adjacentes do controlo com solvente em, pelo menos, duas séries de ensaios independentes (quadro 7). Um produto químico é considerado negativo na sequência de duas séries de ensaios independentes negativas, ou de três séries em que duas se revelaram negativas e uma equívoca ou positiva. Se os dados produzidos por três ensaios independentes não cumprirem os critérios de decisão enumerados no quadro 7, os resultados experimentais não são interpretáveis. Os resultados obtidos com concentrações superiores aos limites de solubilidade ou concentrações citotóxicas não devem ser incluídos na interpretação dos resultados.

Relatório de ensaio

56. O relatório de ensaio deve incluir as seguintes informações:

Estabelecimento de ensaio

— Nome e endereço do estabelecimento;

— Diretor do estudo e outras pessoas envolvidas, com especificação das suas responsabilidades;

— Datas de início e termo do estudo;

▼**M5**

Produto químico em estudo, reagentes e substâncias de controlo

— Identidade (nome/n.º CAS se pertinente), fonte, número de lote ou série, pureza, fornecedor e caracterização do produto químico em estudo, dos reagentes e das substâncias de controlo;

— Natureza física e propriedades fisicoquímicas relevantes do produto químico em estudo;

— Condições de armazenagem; método e frequência de preparação do produto químico em estudo, dos reagentes e das substâncias de controlo;

— Estabilidade do produto químico em estudo;

Células

— Fonte e tipo de células;

— Número (identificador) de passagens celulares das células utilizadas no ensaio;

— Descrição dos procedimentos de conservação das culturas celulares;

Requisitos prévios à realização do ensaio (se pertinente)

— Descrição e resultados do ensaio de interferência produto químico-hormona;

— Descrição e resultados das determinações de eficiência de extração das hormonas;

— Curvas-padrão e de calibração correspondentes a todos os ensaios analíticos a realizar;

— Limites de deteção dos métodos analíticos escolhidos;

Condições de ensaio

— Composição do meio;

— Concentração do produto químico em estudo;

— Densidade celular (concentrações celulares estimadas ou determinadas a 24 e 48 horas)

— Solubilidade do produto químico em estudo (limite de solubilidade, se determinado);

— Tempo e condições de incubação;

Resultados do ensaio

— Dados em bruto para cada alvéolo (substâncias de controlo e produtos químicos em estudo) - cada determinação replicada na forma dos dados originais fornecidos pelo instrumento utilizado para determinar a produção de hormonas (*p.ex.* OD, unidades de fluorescência, DPM, etc.);

— Validação da normalidade ou explicação da transformação dos dados;

— Respostas médias ± 1 desvio-padrão para cada alvéolo determinado;

— Dados de citotoxicidade (concentrações de ensaio que causaram citotoxicidade);

— Confirmação do cumprimento dos requisitos de controlo da qualidade;

▼M5

— Alteração relativamente ao controlo com solvente, com correção para ter em conta a citotoxicidade;

— Gráfico de barras ilustrativo das alterações relativas (fatores multiplicativos) para cada concentração, da SD e da significância estatística, como referido nos pontos 49-54;

Interpretação dos dados

— Aplicação do procedimento de interpretação dos dados aos resultados e discussão das constatações;

Discussão

— Existem algumas indicações, decorrentes do estudo, quanto à possibilidade de os dados relativos à T/E2 terem sido influenciados por efeitos indiretos nas vias dos glucocorticoides e mineralocorticoides?

Conclusões

REFERÊNCIAS

1. OCDE (2002), OECD *Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals* (apêndice 2 do capítulo B.54 do presente anexo)

2. Hecker, M., Newsted, J.L., Murphy, M.B., Higley, E.B., Jones, P.D., Wu, R. and Giesy, J.P. (2006), Human adrenocarcinoma (H295R) cells for rapid in vitro determination of effects on steroidogenesis: Hormone production, *Toxicol. Appl. Pharmacol.,* 217, 114-124.

3. Hecker, M., Hollert, H., Cooper, R., Vinggaard, A.-M., Akahori, Y., Murphy, M., Nellemann, C., Higley, E., Newsted, J., Wu, R., Lam, P., Laskey, J., Buckalew, A., Grund, S., Nakai, M., Timm, G., and Giesy, J. P. (2007), The OECD validation program of the H295R steroidgenesis assay for the identification of in vitro inhibitors or inducers of testosterone and estradiol production, Phase 2: inter laboratory pre-validation studies. *Env. Sci. Pollut. Res*., 14, 23 — 30.

4. OECD (2010), *Multi-Laboratory Validation of the H295R Steroidogenesis Assay to Identify Modulators of Testosterone and Estradiol Production*, OECD Series of Testing and Assessment No. 132, ENV/JM/MONO(2010)31, Paris. Disponível em [http://www.oecd.org/document/30/0,3746,en_2649_34377_1916638_1_1_1_1,00.html]

5. OECD (2010), *Peer Review Report of the H295R Cell-Based Assay for Steroidogenesis,* OECD Series of Testing and Assessment No. 133, ENV/JM/MONO(2010)32, Paris. Disponível em: [http://www.oecd.org/document/30/0,3746,en_2649_34377_1916638_1_1_1_1,00.html]

6. Battelle (2005), Detailed Review Paper on Steroidogenesis. Disponível em: [http://www.epa.gov/endo/pubs/edmvs/steroidogenesis_drp_final_3_29_05.pdf]

7. Hilscherova, K., Jones, P. D., Gracia, T., Newsted, J. L., Zhang, X., Sanderson, J. T., Yu, R. M. K., Wu, R. S. S. and Giesy, J. P. (2004), Assessment of the Effects of Chemicals on the Expression of Ten Steroidogenic Genes in the H295R Cell Line Using Real-Time PCR, *Toxicol. Sci.,* 81, 78--89.

8. Sanderson, J. T., Boerma, J., Lansbergen, G. and Van den Berg, M. (2002), Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by various classes of pesticides in H295R human adrenocortical carcinoma cells, *Toxicol. Appl. Pharmacol.,* 182, 44-54.

9. Breen, M.S., Breen, M., Terasaki, N., Yamazaki, M. and Conolly, R.B. (2010), Computational model of steroidogenesis in human H295R cells to predict biochemical response to endocrine-active chemicals: Model development for metyrapone, *Environ. Health Perspect.,* 118: 265-272.

▼**M5**

10. Higley, E.B., Newsted, J.L., Zhang, X., Giesy, J.P. and Hecker, M. (2010), Assessment of chemical effects on aromatase activity using the H295R cell line, *Environ. Sci. Poll. Res.,* 17:1137-1148.

11. Gazdar, A. F., Oie, H. K., Shackleton, C. H., Chen, T. R., Triche, T. J., Myers, C. E., Chrousos, G. P., Brennan, M. F., Stein, C. A. and La Rocca, R. V. (1990), Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses Multiple pathways of steroid biosynthesis, *Cancer Res.,* 50, 5488-5496.

12. He, Y.H., Wiseman, S.B., Zhang, X.W., Hecker, M., Jones, P.D., El-Din, M.G., Martin, J.W. and Giesy, J.P. (2010), Ozonation attenuates the steroidogenic disruptive effects of sediment free oil sands process water in the H295R cell line, *Chemosphere,* 80:578-584.

13. Zhang, X.W., Yu, R.M.K., Jones, P.D., Lam, G.K.W., Newsted, J.L., Gracia, T., Hecker, M., Hilscherova, K., Sanderson, J.T., Wu, R.S.S. and Giesy, J.P. (2005), Quantitative RT-PCR methods for evaluating toxicant-induced effects on steroidogenesis using the H295R cell line, *Environ. Sci. Technol.,* 39:2777-2785.

14. Higley, E.B., Newsted, J.L., Zhang, X., Giesy, J.P. and Hecker, M. (2010), Differential assessment of chemical effects on aromatase activity, and E2 and T production using the H295R cell line, *Environ. Sci. Pol. Res.,* 17:1137-1148.

15. Rainey, W. E., Bird, I. M., Sawetawan, C., Hanley, N. A., Mccarthy, J. L., Mcgee, E. A., Wester, R. and Mason, J. I. (1993), Regulation of human adrenal carcinoma cell (NCI-H295) production of C19 steroids, *J. Clin. Endocrinol. Metab.,* 77, 731-737.

16. Chapter B.55 of this Annex: Hershberger Bioassay in Rats: A short-term Screening Assay for (Anti)Androgenic Properties.

17. Shapiro, R., and Page, L.B. (1976), Interference by 2,3-dimercapto-1--propanol (BAL) in angiotensin I radioimmunoassay, *J. Lab. Clin. Med.,* 2, 222-231.

18. Mosmann, T. (1983), Rapid colorimetric assay for growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods.,* 65, 55-63.

19. Brock, B.J., Waterman, M.R. (1999). Biochemical differences between rat and human cytochrome P450c17 support the different steroidogenic needs of these two species, Biochemistry. 38:1598-1606.

20. Oskarsson, A., Ulleras, E., Plant, K., Hinson, J. Goldfarb, P.S., (2006), Steroidogenic gene expression in H295R cells and the human adrenal gland: adrenotoxic effects of lindane in vitro, J. Appl. Toxicol., 26:484-492.

▼M5

Apêndice

DEFINIÇÕES

Confluência refere-se à cobertura ou proliferação das células sobre ou no meio de cultura.

Produto químico designa uma substância ou mistura.

CV designa o coeficiente de variação, definido como a razão entre o desvio-padrão de uma distribuição e a sua média aritmética.

CYP designa as mono-oxigenases do citocromo P450, enzimas produzidas por uma família de genes, que catalisam uma vasta gama de reações bioquímicas, nomeadamente a síntese e o metabolismo das hormonas esteroides.

DPM significa desintegrações por minuto. Consiste no número de átomos numa determinada quantidade de matéria radioativa que sofre decaimento num minuto.

E2 designa o 17β-estradiol, estrogénio mais importante nos mamíferos.

As células H295R são células de adenocarcinoma humano, que têm características fisiológicas de células adrenais do feto humano sem diferenciação por zonas que exprimem todas as enzimas implicadas na esteroidogénese. Podem ser obtidas junto do ATCC.

O **meio de congelamento** é utilizado para congelar as células e armazenar as células congeladas. É constituído por meio de partida ao qual se adiciona *NuSerum* BD e dimetilssulfóxido.

Troço linear é o troço da curva-padrão do sistema de determinação de hormonas em que os resultados são proporcionais à concentração de substância a analisar presente na amostra.

LOQ designa o «*limite de quantificação*», que consiste na quantidade mais baixa de um produto químico distinguível da ausência desse produto (ensaio em branco), com um dado intervalo de confiança. Para os fins do presente método, e salvo especificação em contrário, o LOQ é, em geral, definido pelo fabricante do sistema de ensaio.

LOEC designa a menor concentração com efeito observável, concentração mais baixa à qual a resposta no ensaio é estatisticamente diferente da do controlo com solvente.

NOEC designa a concentração sem efeitos observáveis, concentração mais elevada utilizada no ensaio sem que se observe uma resposta positiva.

Passagem designa o número de vezes que as células são divididas após o início de uma cultura a partir de material congelado. À passagem inicial a partir do material congelado é atribuído o número um (1). As células resultantes da primeira divisão correspondem à passagem n.º 2, etc.

PBS designa a solução-tampão salina de fosfatos de Dulbecco.

Controlo de qualidade (CQ) designa as determinações necessárias para assegurar a validade dos dados.

Placa de controlo de qualidade é uma placa de 24 alvéolos com duas concentrações dos controlos positivo e negativo, destinada a monitorizar o desempenho de um novo lote de células ou a fornecer os controlos positivos para o ensaio dos produtos químicos.

Série é um ensaio independente caracterizado por um novo conjunto de soluções e controlos.

▼**M5**

Meio de partida é a base para a preparação dos restantes reagentes. Consiste numa mistura na proporção de 1:1 de meio de Eagle modificado de Dulbecco e mistura de nutrientes F-12 de Ham (DMEM/F12) em tampão HEPES 15 mM, sem adição de vermelho de fenol nem bicarbonato de sódio. Este último é adicionado como tampão — ver o apêndice II do relatório de validação (4).

O **meio suplementado** é constituído por meio de partida ao qual é adicionado *Nu-Serum* BD e *ITS+ premium mix* — ver o apêndice II do relatório de validação (4).

Esteroidogénese é a via metabólica através da qual o colesterol é transformado nas várias hormonas esteroides. Alguns intermediários no processo, como a progesterona e a testosterona, são hormonas importantes por si só, mas constituem também precursores de outras hormonas, a jusante no processo metabólico.

T designaa testosterona, um dos dois androgénios mais importantes nos mamíferos.

Produto químico em estudo designa qualquer substância ou mistura ensaiada por recurso ao presente método de ensaio.

Placa de ensaio é a placa na qual as células H295R são expostas aos produtos químicos em estudo. As placas de ensaio contêm o solvente de controlo e sete concentrações do produto químico em estudo, em triplicado.

Tripsina 1X é a uma solução diluída da enzima tripsina, protease do suco pancreático, utilizada para remover as células de uma placa de cultura — ver o apêndice III do relatório de validação (4).

▼M5

B.58. ENSAIOS DE MUTAÇÕES GENÉTICAS DAS CÉLULAS GERMINATIVAS E SOMÁTICAS DE ROEDORES TRANSGÉNICOS

INTRODUÇÃO

1. Este método de ensaio é equivalente ao ao *Test Guideline* TG 488 (2013) da OCDE. Existem métodos de ensaio da UE para uma ampla variedade de ensaios de mutações *in vitro*, capazes de detetar mutações ao nível dos cromossomas e/ou dos genes. Existem métodos de ensaio para parâmetros *in vivo* (ou seja, aberrações cromossomáticas e síntese não programada de ADN); no entanto, estes métodos não medem as mutações dos genes. Os ensaios de mutações em Roedores Transgénicos (TGR) preenchem a necessidade de ensaios *in vivo* práticos e amplamente disponíveis para mutações dos genes.

2. Os ensaios de mutações em TGR foram analisados de forma aprofundada (24) (33). Usam ratos e ratinhos transgénicos que contêm várias cópias de vetores de transporte de plasmídeos ou fagos integrados nos cromossomas. Os transgenes contêm genes repórter para a deteção de vários tipos de mutações induzidas *in vivo* por produtos químicos.

3. As mutações que surjam num roedor são classificadas através da recuperação do transgene e da análise do fenótipo do gene repórter num hospedeiro bacteriano com o gene repórter ausente. Os ensaios de mutações genéticas em TGR medem as mutações induzidas em genes neutros recuperados de praticamente qualquer tecido do roedor. Portanto, estes ensaios contornam muitas das limitações atualmente associadas ao estudo das mutações genéticas *in vivo* em genes endógenos (p. ex.: número limitado de tecidos adequados à análise, seleção negativa/positiva contra mutações).

4. A experiência adquirida sugere que os transgenes respondem aos agentes mutagénicos de modo semelhante aos genes endógenos, especialmente no que respeita à deteção de substituições de pares de bases, de mutações por deslocamento e de pequenas supressões e inserções(24).

5. Os *International Workshops on Genotoxicity Testing* (IWGT) subscreveram a inclusão dos ensaios de mutações genéticas em TGR para a deteção *in vivo* de mutações genéticas e recomendaram um protocolo para a sua aplicação (15) (29). O presente método de ensaio baseia-se nessas recomendações. A referência (16) inclui análises adicionais que fundamentam a utilização deste protocolo.

6. Espera-se que, no futuro, venha a ser possível combinar um ensaio de mutações genéticas em TGR com um estudo de toxicidade de dose repetida (Capítulo B.7 do presente Anexo). No entanto, são necessários dados para garantir que a sensibilidade dos ensaios de mutações genéticas em TGR não seja afetada pelo período de tempo inferior usado nos estudos de toxicologia de dose repetida: um dia entre o final do período de administração e o momento da amostragem, em comparação com os 3 dias usados nos ensaios de mutações genéticas em TGR. São também necessários mais dados para verificar se o resultado dos ensaios de dose repetida não é negativamente afetado pela utilização de uma estirpe de roedores transgénicos em vez das estirpes de roedores tradicionais. Quando esses dados estiverem disponíveis, o presente método de ensaio será atualizado.

7. Os termos-chave encontram-se definidos no Apêndice.

▼**M5**

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

8. Os ensaios de mutações genéticas em TGR relativamente aos quais existem dados suficientes para apoiar o seu uso neste método de ensaio são: bacteriófago *lacZ* do ratinho (Muta™Mouse); plasmídeo *lacZ* do ratinho; delta *gpt* (*gpt* e Spi$^-$) do ratinho e do rato; *lacI* do ratinho e do rato (Big Blue®), quando conduzidos em condições padrão. Além disso, o ensaio de seleção positiva *cII* poderá ser usado para avaliar mutações nos modelosBig Blue® e Muta™Mouse. Normalmente, a mutagénese é avaliada nos modelos TGR em termos de frequência das mutações; se necessário, no entanto, a análise molecular das mutações pode fornecer informação adicional (ver parágrafo 24).

9. Estes ensaios *in vivo* de mutações genéticas em roedores são especialmente relevantes para a avaliação de riscos mutagénicos, uma vez que as respostas do ensaio dependem do metabolismo *in vivo*, da farmacocinética, dos processos de reparação do ADN e da síntese de ADN translesão, embora estes fatores possam variar conforme as espécies, tecidos e tipos de lesão do ADN. Um ensaio *in vivo* de mutações genéticas poderá ser útil para uma investigação mais aprofundada de um efeito mutagénico detetado num sistema *in vitro* e em complemento dos resultados de ensaios que usem outros parâmetros *in vivo* (24). Para além de ter relação causal com a indução do cancro, a mutação genética é um parâmetro relevante para a previsão de doenças não-oncológicas com base em mutações nalguns tecidos somáticos (12) (13), bem como de doenças transmitidas através da linha germinativa.

10. Se houver evidência de que o produto químico em estudo, ou um metabolito relevante, não atingirá nenhum dos tecidos de interesse, não deverá ser realizado um ensaio de mutações genéticas em TGR.

PRINCÍPIO DO ENSAIO

11. Nos ensaios descritos no parágrafo 8, o gene-alvo é de origem bacteriana ou bacteriofágica e a forma como é recuperado do ADN genómico do roedor é através da incorporação do transgene num vetor de transporte λ bacteriófágico ou plasmídeo. Este procedimento envolve a extração do ADN genómico do tecido de interesse do roedor, o processamento *in vitro* desse ADN genómico (ou seja, empacotamento de vetores λ, ou ligação e eletroporação de plasmídeos para recuperar o vetor de transporte) e a deteção subsequente de mutações em hospedeiros bacterianos, em condições adequadas. Os ensaios empregam transgenes neutros, facilmente obtíveis da maioria dos tecidos.

12. As experiências básicas de ensaio de mutações genéticas em TGR envolvem o tratamento do animal com um produto químico durante um determinado período. Os produtos químicos podem ser administrados por qualquer via adequada, incluindo a implantação (p. ex.: ensaio de dispositivos médicos). O período total durante o qual um animal receberá doses do produto é designado por período de administração. A administração é geralmente seguida de um período, antes do sacrifício, durante o qual o produto químico não é administrado e as lesões do ADN não reparadas se fixam em mutações estáveis. Na literatura, este período tem sido designado por tempo de manifestação, tempo de fixação ou tempo de expressão; o final deste período é o momento de amostragem (15) (29). Depois de o animal ser sacrificado, o ADN genómico é isolado do(s) tecido(s) de interesse e purificado.

▼M5

13. Os dados respeitantes a um único tecido por animal e a vários empacotamentos/ligações são geralmente agregados, e a frequência de mutação é geralmente avaliada usando um total de entre 10^5 e 10^7 unidades formadoras de placas ou formadoras de colónias. Quando se usam métodos de seleção positiva, as unidades formadoras de placas totais são determinadas com um conjunto separado de placas não seletivas.

14. Os métodos de seleção positiva foram desenvolvidos para facilitar a deteção de mutações tanto no gene *gpt* [*gpt* delta em ratinhos e ratos, fenótipo *gpt* $^-$ (20) (22) (28)] como no gene *lacZ* [Muta™Mouse ou plasmídeo *lacZ* no ratinho (3) (10) (11) (30)]; por seu lado, as mutações no gene *lacI* em animais Big Blue® são detetadas através de um método não seletivo que identifica mutações através da geração de placas coloridas (azuis). A metodologia de seleção positiva é também usada para detetar mutações pontuais que surjam no gene *cII* do vetor de transporte λ bacteriofágico [Big Blue® no ratinho ou rato e Muta™Mouse (17)] e mutações de supressão nos genes λ *red* e *gam* [seleção Spi $^-$ no delta *gpt* no ratinho e no rato (21) (22) (28)]. A frequência de mutação é calculada dividindo o número de placas/plasmídeos que apresentam mutações no transgene pelo número total de placas/plasmídeos recuperados da mesma amostra de ADN. Nos estudos de mutações genéticas em TGR, a frequência de mutação é o parâmetro comunicado. Além disso, pode determinar-se uma frequência de mutação como a proporção de células que apresentam mutações independentes; este cálculo exige correção para expansão clonal através da sequenciação dos mutantes recuperados(24).

15. As mutações classificadas nos ensaios de mutações pontuais *lacI, lacZ, cII* e *gpt* consistem principalmente em mutações por substituição de um par de bases, mutações por deslocamento e pequenas inserções/supressões. A proporção relativa destes tipos de mutações entre as mutações espontâneas é semelhante à verificada no gene *Hprt* endógeno. As grandes supressões só são detetadas nos ensaios de seleção Spi $^-$ e ensaios com plasmídeos *lacZ* (24). As mutações de interesse são mutações *in vivo* que surgem no rato ou ratinho. As mutações *in vitro* e *ex vivo*, que podem surgir durante a recuperação, replicação ou reparação dos fagos/plasmídeos, são relativamente raras e, nalguns sistemas, podem ser especificamente identificadas ou excluídas pelo sistema de hospedeiro bacteriano/seleção positiva.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Preparações

Seleção da espécie animal

16. Atualmente, estão disponíveis vários modelos de deteção de mutações génicas em ratinhos transgénicos, mais amplamente usados do que os modelos com ratos transgénicos. Se o rato for claramente um modelo mais adequado do que o ratinho (p. ex.: na investigação do mecanismo de carcinogénese de um tumor apenas observado em ratos, para correlacionar com um estudo de toxicidade em ratos ou se o metabolismo do rato for reconhecidamente mais representativo do metabolismo humano), deve considerar-se a utilização de modelos com ratos transgénicos.

Condições de alojamento e alimentação

17. A temperatura na sala onde são conservados os animais para experiências deve ser, idealmente, de 22 °C (± 3 °C). Embora a humidade relativa deva ser pelo menos de 30 % e, de preferência, não deva exceder os 70 %, exceto durante a limpeza da sala, o objetivo deve ser a manutenção de uma humidade relativa entre os 50 % e os 60 %. A iluminação deve ser artificial, com um ciclo diário de 12 horas de luz seguidas de 12 horas de escuridão. Para a alimentação, podem ser usadas dietas convencionais de laboratório, com acesso ilimitado a água potável. A escolha da dieta pode ser influenciada pela necessidade de garantir uma mistura adequada de um produto

▼M5

químico em estudo, quando administrado por esta via. Os animais devem ser mantidos em pequenos grupos (não mais do que cinco) do mesmo sexo, se não for previsivel um comportamento agressivo. Os animais podem ser alojados individualmente se tal se justificar do ponto de vista científico.

Preparação dos animais

18. Os animais jovens e saudáveis, adultos e sexualmente maturos (8 a 12 semanas de idade no início do tratamento) são aleatoriamente afetados aos grupos de controlo e de tratamento. Os animais são identificados por um código único. Devem ser aclimatizados às condições do laboratório durante pelo menos cinco dias. As gaiolas devem estar dispostas de forma a minimizar os possíveis efeitos devidos à localização. No início do estudo, a diferença de peso entre os animais deve ser mínima e não deve exceder ± 20 % do peso médio de cada sexo.

Preparação das doses

19. Os produtos químicos em estudo na forma sólida devem ser dissolvidos ou suspensos em solventes ou veículos adequados, ou misturados na dieta ou na água potável antes da administração aos animais. Os produtos químicos em estudo na forma líquida podem ser administrados diretamente ou diluídos antes da administração. Para exposições por inalação, os produtos químicos em estudo podem ser administrados sob a forma de gás, vapor ou aerossol sólido/líquido, dependendo das respetivas propriedades físico-químicas. Devem ser utilizadas preparações frescas do produto químico em estudo, a menos que os dados de estabilidade demonstrem que o mesmo pode ser armazenado.

Condições de Ensaio

Solvente/veículo

20. O solvente/veículo não deve produzir efeitos tóxicos nos volumes utilizados e não devem existir indícios de reação química com o produto químico em estudo. Se forem usados solventes/veículos pouco conhecidos, a sua utilização deverá ser fundamentada por dados de referência que indiquem a sua compatibilidade. Recomenda-se que, sempre que possível, se considere em primeiro lugar a utilização de um solvente/veículo aquoso.

Controlos Positivos

21. Normalmente, devem ser usados animais de controlo positivo em simultâneo. No entanto, para laboratórios que tenham demonstrado competência (ver parágrafo 23) e que usem rotineiramente estes ensaios, o ADN de animais anteriormente utilizados como controlo positivo pode ser incluído em cada estudo para confirmar o sucesso do método. Esse ADN de experiências anteriores deve ser obtido a partir da mesma espécie e dos mesmos tecidos de interesse e armazenado adequadamente (ver parágrafo 36). Quando são usados controlos positivos em simultâneo, não é necessário administrá-los pela mesma via usada para o produto químico em estudo; no entanto, os controlos positivos devem induzir comprovadamente mutações em um ou mais tecidos de interesse para o produto químico em estudo. As doses dos produtos químicos do controlo positivo devem ser selecionadas de modo a produzir efeitos fracos ou moderados que permitam avaliar criticamente o funcionamento e a sensibilidade do ensaio. O Quadro 1 inclui exemplos de produtos químicos de controlo positivo e de alguns dos respetivos tecidos-alvo.

▼M5

Quadro 1

Exemplos de produtos químicos de controlo positivo e de alguns dos respetivos tecidos-alvo

Produto Químico de Controlo Positivo e N.º CAS	Nome e N.º EINECS	Características	Tecido-alvo de Mutação	
			Rato	Ratinho
N-Etilo-N-nitrosureia [N.º CAS 759-73-9]	N-Etilo-N-nitrosureia [212-072-2]	Agente mutagénico de ação direta	Fígado, pulmão	Medula óssea, cólon, epitélio do cólon, intestino, fígado, pulmão, baço, rim, células granulosas do ovário, células germinativas masculinas
Carbamato de etilo (uretano) [N.º CAS 51-79-6]	Uretano [200-123-1]	Agente mutagénico, exige metabolismo mas produz apenas efeitos fracos		Medula óssea, pré-estômago, intestino delgado, fígado, pulmão, baço
2,4-Diaminotolueno [N.º CAS 95-80-7]	4-Metil-m-fenileno-diamina [202-453-1]	Agente mutagénico, exige metabolismo, também positivo no ensaio Spi^-	Fígado	Fígado
Benzo[a]pireno [N.º CAS 50-32-8]	Benzo[def]criseno [200-028-5]	Agente mutagénico, exige metabolismo	Fígado, omento	Medula óssea, mama, cólon, pré-estômago, estômago glandular, coração, fígado, pulmão, células germinativas masculinas

Controlos negativos

22. Cada amostragem deve incluir controlos negativos, tratados apenas com solvente ou veículo e em todos os outros aspetos tratados da mesma forma que os grupos de tratamento. Na ausência de dados de controlo históricos ou publicados que demonstrem que o solvente/veículo escolhido não induz nenhum efeito prejudicial ou mutagénico, cada amostragem deverá também incluir controlos sem tratamento, de modo a estabelecer a aceitabilidade do controlo do veículo.

Verificação da proficiência do laboratório

23. A competência nestes ensaios deve ser estabelecida através da demonstração da capacidade de reproduzir os resultados esperados a partir de dados publicados (24) para: 1) frequências de mutação com produtos químicos de controlo positivo (incluindo respostas fracas) como os listados no quadro 1, não-mutagénicos e controlos do veículo; e 2) recuperação de transgenes do ADN genómico (p. ex.: eficiência de empacotamento).

Sequenciação de mutações

24. Para aplicações normativas, não é exigida a sequenciação do ADN dos mutantes, especialmente quando for obtido um resultado positivo ou negativo claro. No entanto, os dados de sequenciação podem ser úteis quando se observa uma elevada variação interindividual. Nestes casos, a sequenciação pode ser usada para excluir a possibilidade de *jackpots* ou eventos de clonagem, ao identificar a proporção de mutantes únicos de um tecido em particular. A sequenciação de cerca de 10 mutantes por tecido e por animal deverá ser suficiente para determinar simplesmente se a clonagem contribuiu para a frequência de mutação; poderá ser necessário sequenciar até 25 mutantes para corrigir matematicamente a frequência de mutação para os efeitos da clonagem clonagem. A sequenciação dos mutantes

▼M5

pode também ser considerada quando se constatarem pequenos aumentos (ou seja, pouco acima dos valores do controlo não tratado) nas frequências de mutação. As diferenças no espectro de mutantes entre as colónias mutantes de animais tratados e não tratados podem apoiar as suspeitas de um efeito mutagénico (29). Além disso, os espectros de mutações poderão ser úteis para desenvolver hipóteses mecanísticas. Quando for necessário incluir a sequenciação no protocolo do estudo, deve dedicar-se particular atenção à conceção do mesmo, em particular no que se refere ao número de mutantes sequenciados por amostra, de modo a assegurar uma cobertura suficiente de acordo com o modelo estatístico usado (ver parágrafo 43).

PROCEDIMENTO

Número e Sexo dos Animais

25. O número de animais por grupo deve ser predeterminado de modo a ser suficiente para proporcionar a validade estatística necessária para detetar pelo menos uma duplicação na frequência de mutação. Os grupos terão pelo menos cinco animais; no entanto, se a validade estatística não for suficiente, o número de animais deve ser aumentado conforme necessário. Normalmente, devem ser usados machos. Pode haver casos em que se justifique testar apenas fêmeas, por exemplo no ensaio de medicamentos específicos para mulheres ou na investigação do metabolismo específico do sexo feminino. Se houver diferenças significativas entre os sexos em termos de toxicidade ou de metabolismo, será necessário utilizar machos e fêmeas.

Período de Administração

26. Com base em observações que demonstram a acumulação de mutações com cada tratamento, é necessário aplicar um regime de dose repetida, com tratamentos diários por um período de 28 dias. Este período é geralmente considerado aceitável, tanto para produzir uma acumulação suficiente de mutações por agentes mutagénicos fracos como para oferecer um tempo de exposição adequado para deteção de mutações em órgãos de proliferação lenta. Para algumas avaliações, podem ser adequados regimes de tratamento alternativos, cujos esquemas de doseamento alternativos devem ser cientificamente justificados no protocolo. Os tratamentos não devem ser mais curtos do que o tempo necessário para completar a indução de todas as enzimas metabólicas relevantes e os tratamentos mais curtos poderão exigir a utilização de vários pontos de amostragem adequados para órgãos com diferentes taxas de proliferação. De qualquer modo, toda a informação disponível (p. ex.: sobre toxicidade geral ou sobre o metabolismo e a farmacocinética) deve ser usada na justificação de um protocolo, especialmente quando este se desviar das recomendações padrão supracitadas. Embora possam aumentar a sensibilidade, os tratamentos mais longos do que 8 semanas devem ser claramente explicados e justificados, uma vez que tempos de tratamento prolongados podem produzir um aumento aparente na frequência de mutação através da expansão clonal (29).

Níveis de Dosagem

27. Os níveis de dosagem devem ser baseados nos resultados de um estudo de determinação de intervalos de dosagem que meça a toxicidade geral e que tenha sido conduzido pela mesma via de exposição, ou nos resultados de estudos de toxicidade subaguda pré-existentes. Podem usar-se animais não transgénicos da mesma estirpe de roedores para a determinação dos intervalos de dosagem. No ensaio principal, e a fim de obter informação sobre a resposta à dosagem, um estudo completo deve incluir um grupo de controlo negativo (ver parágrafo 22) e um mínimo de três níveis de dose, adequadamente espaçados, exceto quando for utilizada uma dose limite (ver parágrafo 28). A dose superior deve ser a Dose Máxima Tolerada (DMT). A DMT é definida como a dose que produz sinais de toxicidade tais que

▼M5

níveis de dose superiores, baseados no mesmo regime de doseamento, seriam letais. Os produtos químicos com atividades biológicas específicas em doses baixas não tóxicas (como hormonas e agentes mitogénicos) e produtos químicos que apresentem saturação de propriedades toxicocinéticas podem ser exceções aos critérios de definição da dosagem e devem ser avaliados caso a caso. Os níveis de dose usados devem abarcar um intervalo desde a toxicidade máxima até uma toxicidade reduzida ou ausente.

Ensaio de Limite

28. Se as experiências de determinação de intervalos de dosagem, ou dados existentes de estirpes relacionadas de roedores, indicarem que um regime de tratamento com, pelo menos, a dose limite (ver abaixo) não produz efeitos tóxicos observáveis,e se não for de esperar genotoxicidade com base em dados relativos a produtos químicos estruturalmente relacionados, poderá não ser considerado necessário um estudo completo com três níveis de dose. Para um período de administração de 28 dias (ou seja, 28 tratamentos diários), a dose limite é de 1 000 mg/kg de peso corporal/dia. Para períodos de administração de 14 dias ou menos, a dose limite é de 2 000 mg/kg/de peso corporal/dia (os esquemas de doseamento que se afastem dos 28 tratamentos diários devem ser cientificamente justificados no protocolo; ver parágrafo 26).

Administração das Doses

29. O produto químico em estudo é geralmente administrado por gavagem, usando uma sonda gástrica ou uma cânula de intubação adequada. De modo geral, a via antecipada de exposição humana deve ser considerada na conceção de um ensaio. Portanto, outras vias de exposição (tais como água potável, via subcutânea, intravenosa, tópica, por inalação, intratraqueal, na dieta ou por implantação) podem ser aceitáveis, quando puderem ser justificadas. A injeção intraperitonial não é recomendada, uma vez que não é uma via fisiologicamente relevante de exposição humana. O volume máximo de líquido que pode ser administrado por gavagem ou injeção de uma só vez depende do tamanho do animal de ensaio. O volume não deve exceder os 2 ml/100 g de peso corporal. A utilização de volumes superiores deverá ser justificada. Exceto no caso de produtos químicos irritantes ou corrosivos, que normalmente revelam efeitos exacerbados em concentrações superiores, a variabilidade no volume de ensaio deve ser minimizada ajustando a concentração de modo a garantir um volume constante em todos os níveis de dose.

Momento de Amostragem

Células Somáticas

30. O momento da amostragem é uma variável crítica, porque é determinado pelo tempo necessário para que as mutações se fixem. Este período é específico para cada tecido e parece estar relacionado com o tempo de substituição da população de células, sendo que a medula óssea e o intestino são tecidos de resposta rápida e o fígado apresenta uma resposta muito mais lenta. Um compromisso aceitável para a medição de frequências de mutação tanto em tecidos de proliferação rápida como lenta é 28 tratamentos diários consecutivos (conforme indicado no parágrafo 26), com amostragem três dias depois do tratamento final, embora a frequência de mutação máxima possa não se manifestar em tecidos de proliferação lenta nestas condições. Se os tecidos de proliferação lenta assumirem particular importância, poderá ser mais adequada uma amostragem mais tardia, 28 dias após o período de administração de 28 dias (16) (29). Nesses casos, a amostragem mais tardia substituirá a amostragem aos 3 dias e exigirá justificação científica.

▼M5

Células Germinativas

31. Os ensaios em TGR são adequados para o estudo da indução de mutações genéticas em células germinativas masculinas (7) (8) (27), em que o tempo e a cinética da espermatogénese tenham sido bem definidos (27). O número reduzido de óvulos disponíveis para análise, mesmo depois de superovulação, e o facto de não haver síntese de ADN no ovócito impedem a determinação de mutações em células germinativas femininas usando ensaios transgénicos (31).

32. Os momentos de amostragem para as células germinativas masculinas devem ser selecionados de modo a recolher amostras de todos os tipos de células expostas durante o desenvolvimento das células germinativas e a que o estádio-alvo da amostragem tenha recebido uma exposição suficiente. O tempo necessário para a progressão das células germinativas em desenvolvimento desde a fase das células estaminais espermatogoniais até à fase dos espermatozóides maduros que chegam ao ducto deferente/cauda do epidídimo é de~49 dias no ratinho (36) e de ~70 dias no rato (34) (35). Após uma exposição de 28 dias com um período subsequente de amostragem de três dias, o esperma acumulado, colhido no ducto deferente/cauda do epidídimo (7) (8), representa uma população de células expostas durante aproximadamente a última metade da espermatogénese, que inclui o período mitótico e pós-mitótico, mas não o período espermatogonial ou as células estaminais. Para obter amostras adequadas das células presentes no ducto deferente/cauda do epidídimo que estavam no estádio de células estaminais espermatogoniais durante o período de exposição, é necessário um momento de amostragem adicional, no mínimo às 7 semanas (ratinhos) ou 10 semanas (rato) após o final do tratamento.

33. As células extraídas dos túbulos seminíferos após um regime de 28 + 3 dias contêm uma população mista enriquecida para todos os estádios das células germinativas em desenvolvimento (7) (8). Colher amostras destas células para deteção de mutações genéticas não fornece uma avaliação tão precisa dos estádios nos quais as mutações das células germinais foram induzidas, como a que pode ser obtida através da colheita de amostras de espermatozóides do ducto deferente/cauda do epidídimo (uma vez que as células germinativas colhidas nos túbulos são de diferentes tipos e haverá algumas células somáticas a contaminar esta população celular). No entanto, a colheita de amostras de células dos túbulos seminíferos, para além da recolha de espermatozóides do ducto deferente/cauda do epidídimo após um regime de amostragem de apenas 28 + 3 dias, permitirá alguma cobertura das células expostas ao longo da maior parte das fases de desenvolvimento das células germinativas e poderá ser útil para detetar alguns agentes mutagénicos de células germinativas.

Observações

34. Devem ser feitas observações clínicas gerais pelo menos uma vez por dia, de preferência à(s) mesma(s) hora(s) todos os dias e tendo em consideração o período de pico de efeitos antecipados após a administração da dose. A condição de saúde dos animais deve ser registada. Pelo menos duas vezes por dia, todos os animais devem ser observados quanto a sinais de morbilidade e mortalidade. Todos os animais devem ser pesados pelo menos uma vez por semana e no momento do sacrifício. Pelo menos uma vez por semana, devem ser realizadas medições do consumo de alimentos. Se o produto químico em estudo for administrado através de água potável, o consumo de água deve ser medido em cada mudança de água e pelo menos uma vez por semana. Os animais que exibam indicadores não letais de toxicidade excessiva devem ser eutanasiados antes da conclusão do período de ensaio (23).

▼M5

Colheita de tecidos

35. A fundamentação lógica para a colheita de tecidos deve ser definida de forma clara. Uma vez que é possível estudar a indução de mutações em praticamente qualquer tecido, a seleção dos tecidos a colher deve basear-se no motivo para a realização do estudo e quaisquer dados de mutagenicidade, carcinogenicidade ou toxicidade existentes para o produto químico que esteja a ser investigado. Nos fatores importantes a considerar devem incluir-se a via de administração [com base na(s) via(s) de exposição humana provável(is)], a distribuição prevista do tecido e o possível mecanismo de ação. Na ausência de qualquer informação de contexto, deverão ser colhidos vários tecidos somáticos que poderão apresentar interesse, respresentativos dos tecidos de proliferação rápida, de proliferação lenta e dos locais de contacto. Além disso, os espermatozóides do ducto deferente/ /cauda do epidídimo e as células germinativas em desenvolvimento provenientes dos túbulos seminíferos (como descrito nos parágrafos 32 e 33) devem ser colhidos e armazenados para a eventualidade de que seja necessária uma análise futura da mutagenicidade das células germinativas. Deve ser obtido o peso dos órgãos e, para os órgãos de maiores dimensões, a mesma área do órgão deverá ser recolhida em todos os animais.

Armazenamento de tecidos e ADN

36. Os tecidos (ou homogeneizados de tecido) devem ser armazenados a uma temperatura de – 70 °C ou inferior e ser utilizados para isolamento do ADN no prazo de 5 anos. O ADN isolado, armazenado refrigerado a 4 °C em tampão adequado, deverá idealmente ser utilizado para análise das mutações no prazo de 1 ano.

Seleção de tecidos para análise das mutações

37. A escolha de tecidos deve basear-se em considerações como: 1) a via de administração ou o local de primeiro contacto (p. ex.: estômago glandular, se a administração for oral, pulmão, se a administração for por inalação, ou pele, se for utilizada uma aplicação tópica); e 2) os parâmetros farmacocinéticos observados em estudos de toxicidade geral que indiquem disposição, retenção ou acumulação nos tecidos ou órgãos-alvo para a toxicidade. Se forem realizados estudos na sequência de estudos de carcinogenicidade, devem ser considerados os tecidos-alvo dessa carcinogenicidade. A escolha dos tecidos para análise deve maximizar a deteção dos produtos químicos que sejam mutagénicos de ação direta *in vitro*, rapidamente metabolizados, altamente reativos ou mal absorvidos, ou aqueles para os quais o tecido-alvo é determinado pela via de administração (6).

38. Na ausência de informação contextual e tendo em consideração o local de contacto decorrente da via de administração, o fígado e pelo menos um tecido de divisão rápida (p. ex.: estômago glandular, medula óssea) devem ser avaliados em termos de mutagenicidade. Na maioria dos casos, os requisitos acima podem ser preenchidos a partir de análises de dois tecidos cuidadosamente selecionados, mas nalguns casos será necessário analisar três ou mais tecidos diferentes. Se houver motivos de preocupação específica com os efeitos sobre as células germinativas, incluindo respostas positivas em células somáticas, os tecidos de células germinativas devem ser avaliados para mutações.

Métodos de Medição

39. Existem métodos laboratoriais padrão ou que se encontram publicados para a deteção de mutações nos modelos transgénicos recomendados: bacteriófago e plasmídeo lambda *lacZ* (30); *lacI* no ratinho (2) (18); delta *gpt* no ratinho (22); delta *gpt* no rato (28); *cII* (17). As modificações devem ser justificadas e devidamente documentadas. Os dados de vários pacotes podem ser agregados e utilizados para se obter um número adequado de placas ou colónias. No entanto, a necessidade de um grande número de reações de empacotamento para se obter um número adequado de placas pode ser uma indicação de qualidade insuficiente do ADN. Nesses casos, os dados devem ser considerados com precaução, pois podem não ser fiáveis. O número total ideal de placas ou colónias por amostra de ADN é regido pela probabilidade estatística de deteção de números suficientes de mutações numa determinada frequência de mutação espontânea. Geralmente é necessário um

▼M5

mínimo de 125 000 a 300 000 placas se a frequência de mutação espontânea estiver na ordem de 3×10^{-5} (15). Para o ensaio Big Blue® *lacI*, é importante demonstrar que é possível detetar toda a gama de fenótipos mutantes na côr, através da inclusão de controlos de côr adequados em cada conjunto de placas. Os tecidos e as amostras (ou órgãos) resultantes devem ser processados e analisados utilizando uma conceção em bloco, na qual as amostras provenientes do grupo de controlo veículo/solvente, do grupo de controlo positivo (se for utilizado) ou do ADN de controlo positivo (quando apropriado) e de cada grupo de tratamento sejam processados em conjunto.

DADOS E RELATÓRIOS

Tratamento dos resultados

40. Os dados relativos a cada animal devem ser apresentados num quadro. A unidade experimental é o animal. O relatório deve incluir o número total de unidades formadoras de placas (pfu) ou unidades formadoras de colónias (cfu), o número de mutações e a frequência de mutação para cada tecido de cada animal. Se houver várias reações empacotamento/resgate, deve ser comunicado o número de reações por amostra de ADN. Embora devam ser conservados os dados respeitantes a cada reação individual, só é necessário comunicar os totais de pfu ou cfu. Devem ser comunicados os dados relativos à toxicidade e aos sinais clínicos, em conformidade com o parágrafo 34. Todos os resultados de sequenciamento devem ser apresentados para cada mutação analisada e devem ser apresentados os cálculos da frequência de mutação resultantes para cada animal e tecido.

Avaliação e interpretação estatística dos resultados

41. Existem vários critérios para determinar um resultado positivo, tais como um aumento na frequência de mutação relacionado com a dose ou um claro aumento na frequência de mutação de um único grupo de dosagem comparativamente ao grupo de controlo de solvente/veículo. Devem ser analisados pelo menos três grupos tratados, de modo a proporcionar dados suficientes para uma análise da resposta à dosagem. Embora a relevância biológica dos resultados deva ser a principal consideração, podem ser utilizados métodos estatísticos adequados auxiliares da avaliação dos resultados dos ensaios (4) (14) (15) (25) (26). Os testes estatísticos utilizados devem ter em consideração o animal como unidade experimental.

42. Um produto químico em estudo para o qual os resultados não cumpram os critérios acima em qualquer tecido é considerado não mutagénico neste ensaio. Para a relevância biológica de um resultado negativo, a exposição do tecido deve ser confirmada.

43. Para as análises de sequenciamento de ADN, está disponível uma série de abordagens estatísticas para auxiliar na interpretação dos resultados (1) (5) (9) (19).

44. A consideração sobre se os valores observados estão dentro ou fora da faixa de controlo histórico pode fornecer orientações para a avaliação da significância biológica da resposta (32).

▼M5

Relatório de ensaio

45. O relatório de ensaio deve incluir a seguinte informação:

Produto químico em estudo:

— dados de identificação e n.º CAS, se for conhecido;

— fonte, número do lote, se disponível;

— natureza física e pureza;

— propriedades físico-químicas relevantes para a realização do estudo;

— estabilidade do produto químico em estudo, se conhecida;

Solvente/veículo:

— justificação da escolha do veículo;

— solubilidade e estabilidade do produto químico em estudo no solvente/veículo, se conhecidas;

— preparação de fórmulas alimentares, na água potável ou inaláveis;

— determinações analíticas sobre essas fórmulas (p. ex.: estabilidade, homogeneidade, concentrações nominais);

Animais de ensaio:

— espécie/estirpe utilizada e justificação da escolha;

— número, idade e sexo dos animais;

— proveniência, condições de alojamento, dieta administrada, etc.;

— peso de cada animal no início do ensaio, incluindo o intervalo de pesos corporais, a média e o desvio-padrão para cada grupo;

Condições de ensaio:

— dados de controlo positivos e negativos (veículo/solvente);

— dados do estudo de determinação de intervalos de dosagem;

— motivo da escolha da gama de dosagem;

— detalhes da preparação do produto químico em estudo;

— detalhes relativos à administração do produto químico em estudo;

— justificação da via de administração escolhida;

— métodos de medição da toxicidade para os animais, incluindo, sempre que disponíveis, análises histopatológicas ou hematológicas e a frequência com que foram realizadas observações dos animais e dos respetivos pesos corporais;

— métodos de verificação de que o produto químico em estudo atingiu o tecido-alvo, ou a circulação geral, se os resultados forem negativos;

▼M5

— dose real (mg/kg de peso corporal/dia), calculada a partir da concentração do produto químico em estudo nos alimentos/água potável (ppm) e do consumo, se aplicável;

— pormenores relativos à qualidade dos alimentos e da água;

— descrição detalhada do tratamento e calendários de amostragem e justificação das escolhas feitas;

— método de eutanásia;

— procedimentos para o isolamento e preservação de tecidos;

— métodos para o isolamento de ADN genómico de roedor, resgate do transgene a partir de ADN genómico e transferência do ADN transgénico para um hospedeiro bacteriano;

— números de origem e lote de todas as células, *kits* e reagentes (quando aplicável);

— métodos para a enumeração das mutações;

— métodos de análise molecular das mutações e utilização na correção para a clonalidade e/ou para o cálculo das frequências de mutação, se aplicável;

Resultados:

— condição do animal antes e durante o período de ensaio, incluindo sinais de toxicidade;

— pesos corporal e dos órgãos no momento do sacrifício;

— para cada tecido/animal, número de mutações, número de placas ou colónias avaliadas e frequência das mutações;

— para cada grupo de tecidos/animais, número de reações de empacotamento por amostra de ADN, número total de mutações, frequência média de mutação, desvio padrão;

— relação dose-resposta, quando possível;

— para cada tecido/animal, número de mutações independentes e frequência de mutação média, sempre que tenha sido realizada uma análise molecular das mutações;

— dados históricos e simultâneos sobre o controlo negativo, com intervalos, médias e desvios-padrão;

— dados de controlo positivo simultâneos (ou controlo positivo de ADN não simultâneo);

— determinações analíticas, se disponíveis (p. ex.: concentrações de ADN utilizadas nos empacotamentos, dados de sequenciação do ADN);

— análise estatística e métodos aplicados;

Discussão dos resultados

Conclusão

▼M5

REFERÊNCIAS

1. *Adams,* W.T. and T.R. *Skopek* (1987), 'Statistical *Test* for the Comparison of Samples from Mutational Spectra', *J. Mol. Biol*., 194: 391-396.

2. Bielas, J.H. (2002), 'A more Efficient Big Blue® Protocol Improves Transgene Rescue and Accuracy in an Adduct and Mutation Measurement', *Mutation Res*., 518: 107–112.

3. Boerrigter, M.E., M.E. Dollé, H.-J. Martus, J.A. Gossen and J. Vijg (1995), 'Plasmid-based Transgenic Mouse Model for Studying *in vivo* Mutations', *Nature*, 377(6550): 657–659

4. Carr, G.J. and N.J. Gorelick (1995), 'Statistical Design and Analysis of Mutation Studies in Transgenic Mice', *Environ. Mol. Mutagen*, 25(3): 246–255.

5. Carr, G.J. and N.J. Gorelick (1996), 'Mutational Spectra in Transgenic Animal Research: Data Analysis and Study Design Based upon the Mutant or Mutation Frequency', *Environ. Mol. Mutagen,* 28: 405–413.

6. Dean, S.W., T.M. Brooks, B. Burlinson, J. Mirsalis, B. Myhr, L. Recio and V. Thybaud (1999), 'Transgenic Mouse Mutation Assay Systems can Play an important Role in Regulatory Mutagenicity Testing *in vivo* for the Detection of Site-of-contact Mutagens', *Mutagenesis*, 14(1): 141–151.

7. Douglas, G.R., J. Jiao, J.D. Gingerich, J.A. Gossen and L.M. Soper(1995), 'Temporal and Molecular Characteristics of Mutations Induced by Ethylnitrosourea in Germ Cells Isolated from Seminiferous Tubules and in Spermatozoa of *lacZ* Transgenic Mice', *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 7485--7489.

8. Douglas, G.R., J.D. Gingerich, L.M. Soper and J. Jiao (1997), 'Toward an Understanding of the Use of Transgenic Mice for the Detection of Gene Mutations in Germ Cells', *Mutation Res*., 388(2-3): 197-212.

9. Dunson, D.B. and K.R. Tindall (2000), 'Bayesian Analysis of Mutational Spectra', *Genetics*, 156: 1411–1418.

10. Gossen, J.A., W.J. de Leeuw, C.H. Tan, E.C. Zwarthoff, F. Berends, P.H. Lohman, D.L. Knook and J. Vijg(1989), 'Efficient Rescue of Integrated Shuttle Vectors from Transgenic Mice: a Model for Studying Mutations *in vivo', Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 86(20): 7971–7975.

11. Gossen, J.A. and J. Vijg (1993), 'A Selective System for lacZ-Phage using a Galactose-sensitive *E. coli* Host', *Biotechniques*, 14(3): 326, 330.

12. Erikson, R.P. (2003), 'Somatic Gene Mutation and Human Disease other than Cancer', *Mutation Res.*, 543: 125-136.

13. Erikson, R.P. (2010), 'Somatic Gene Mutation and Human Disease other than Cancer: an Update', *Mutation Res.*, **705: 96-106**.

14. Fung, K.Y., G.R. Douglas and D. Krewski (1998), 'Statistical Analysis of *lacZ* Mutant Frequency Data from Muta™Mouse Mutagenicity Assays', *Mutagenesis*, 13(3): 249–255.

15. Heddle, J.A., S. Dean, T. Nohmi, M. Boerrigter, D. Casciano, G.R. Douglas, B.W. Glickman, N.J. Gorelick, J.C. Mirsalis, H.-J Martus, T.R. Skopek, V. Thybaud, K.R.Tindall and N. Yajima (2000), 'In vivo Transgenic Mutation Assays', *Environ. Mol. Mutagen*., 35: 253-259.

16. Heddle, J.A., H.-J. Martus and G.R. Douglas (2003), 'Treatment and Sampling Protocols for Transgenic Mutation Assays', *Environ. Mol. Mutagen.*, 41: 1-6.

▼**M5**

17. Jakubczak, J.L., G. Merlino, J.E. French, W.J. Muller, B. Paul, S. Adhya and S. Garges (1996), 'Analysis of Genetic Instability during Mammary Tumor Progression using a novel Selection-based Assay for *in vivo* Mutations in a Bacteriophage λ Transgene Target', *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93(17): 9073–9078.

18. Kohler, S.W., G.S. Provost, P.L. Kretz, A. Fieck, J.A. Sorge and J.M. Short (1990), 'The Use of Transgenic Mice for Short-term, in vivo Mutagenicity Testing', *Genet. Anal. Tech. Appl.*, 7(8): 212–218.

19. Lewis P.D., B. Manshian, M.N. Routledge, G.B. Scott and P.A. Burns (2008), 'Comparison of Induced and Cancer-associated Mutational Spectra using Multivariate Data Analysis', *Carcinogenesis*, 29(4): 772-778.

20. Nohmi, T., M. Katoh, H. Suzuki, M. Matsui, M. Yamada, M. Watanabe, M. Suzuki, N. Horiya, O. Ueda, T. Shibuya, H. Ikeda and T. Sofuni (1996), 'A new Transgenic Mouse Mutagenesis Test System using Spi — and 6-thioguanine Selections', *Environ. Mol. Mutagen.*, 28(4): 465–470.

21. Nohmi, T., M. Suzuki, K. Masumura, M. Yamada, K. Matsui, O. Ueda, H. Suzuki, M. Katoh, H. Ikeda and T. Sofuni (1999), 'Spi $^-$ Selection: an Efficient Method to Detect γ-ray-induced Deletions in Transgenic Mice', *Environ. Mol. Mutagen*., 34(1): 9–15.

22. Nohmi, T., T. Suzuki and K.I. Masumura (2000), 'Recent Advances in the Protocols of Transgenic Mouse Mutation Assays', *Mutation Res.*, 455(1–2): 191–215.

23. OCDE (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Series on Testing and Assessment, N.º 19, ENV/JM/ /MONO(2000)7, OECD, Paris.

24. OCDE (2009), Detailed Review Paper on Transgenic Rodent Mutation Assays, *Series on Testing and Assessment*, N.º 103, ENV/JM/MONO(2009)7, OECD, Paris.

25. Piegorsch, W.W., B.H. Margolin, M.D. Shelby, A. Johnson, J.E. French, R.W. Tennant and K.R. Tindall (1995), 'Study Design and Sample Sizes for a lacI Transgenic Mouse Mutation Assay', *Environ. Mol. Mutagen.*, 25(3): 231–245.

26. Piegorsch, W.W., A.C. Lockhart, G.J. Carr, B.H. Margolin, T. Brooks, … G.R. Douglas, U.M. Liegibel, T. Suzuki, V. Thybaud, J.H. van Delft and N.J. Gorelick (1997), 'Sources of Variability in Data from a Positive Selection lacZ Transgenic Mouse Mutation Assay: an Interlaboratory Study', Mutation. Res., 388(2–3): 249–289.

27. Singer, T.M., I.B. Lambert, A. Williams, G.R. Douglas and C.L. Yauk (2006), 'Detection of Induced Male Germline Mutation: Correlations and Comparisons between Traditional Germline Mutation Assays, Transgenic Rodent Assays and Expanded Simple Tandem Repeat Instability Assays', *Mutation. Res.*, 598: 164-193.

28. Toyoda-Hokaiwado, N., T. Inoue, K. Masumura, H. Hayashi, Y. Kawamura, Y. Kurata, M. Takamune, M. Yamada, H. Sanada, T. Umemura, A. Nishikawa and T. Nohmi (2010), 'Integration of in vivo Genotoxicity and Short-term Carcinogenicity Assays using F344 gpt delta Transgenic Rats: in vivo Mutagenicity of 2,4-diaminotoluene and 2,6-diaminotoluene Structural Isomers', *Toxicol. Sci.*, 114(1): 71-78.

29. Thybaud, V., S. Dean, T. Nohmi, J. de Boer, G.R. Douglas, B.W. Glickman, N.J. Gorelick, J.A. Heddle, R.H. Heflich, I. Lambert, H.-J. Martus, J.C. Mirsalis, T. Suzuki and N. Yajima (2003), '*In vivo* Transgenic Mutation Assays', *Mutation Res*., 540: 141-151.

30. Vijg, J. and G.R. Douglas (1996), 'Bacteriophage λ and Plasmid *lacZ* Transgenic Mice for studying Mutations *in vivo*' in: G. Pfeifer (ed.), *Technologies for Detection of DNA Damage and Mutations, Part II,* Plenum Press, New York, NY, USA, p. 391–410.

▼**M5**

31. Yauk, C.L., J.D. Gingerich, L. Soper, A. MacMahon, W.G. Foster and G.R. Douglas (2005), 'A *lacZ* Transgenic Mouse Assay for the Detection of Mutations in Follicular Granulosa Cells', *Mutation Res*., 578(1-2): 117-123.

32. Hayashi, M., K. Dearfield, P. Kasper, D. Lovell, H.-J. Martus, V. Thybaud (2011), 'Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data', Mutation Res., doi:10.1016/j.mrgentox.2010.09.007.

33. OCDE (2011), Retrospective Performance Assessment of OECD Test Guideline on Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays, *Series on Testing and Assessment*, N.º 145, ENV/JM/MONO(2011)20, OECD, Paris.

34. Clermont, Y. (1972), 'Kinetics of spermatogenesis in mammals seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal'. *Physiol. Rev.* 52: 198--236.

35. Robaire, B., Hinton, B.T., and Oregbin-Crist, M.-C. (2006), 'The Epididymis', in Neil, J.D., Pfaff, D.W., Chalis, J.R.G., de Kretser, D.M., Richards, J.S., and P. M, Wassarman (eds.), *Physiology of Reproduction*, Elsevier, the Netherlands, p. 1071-1148.

36. Russell, L.B. (2004), 'Effects of male germ-cell stage on the frequency, nature, and spectrum of induced specific-locus mutations in the mouse', *Genetica*, 122: 25–36.

▼M5

Apêndice

DEFINIÇÕES

Período de administração: o período total durante o qual um animal é exposto a uma dose do produto químico.

Substituição de um par de bases: um tipo de mutação que provoca a substituição de uma única base de nucleotídeos do ADN por outra base de nucleotídeos do ADN.

Cápside: o invólucro proteico que envolve uma partícula viral.

Produto químico: uma substância ou uma mistura.

Expansão clonal: a produção de muitas células a partir de uma única célula (mutante).

Unidades formadoras de colónias (cfu): uma medida do número de bactérias viáveis.

Concatâmero: uma biomolécula contínua e longa constituída por várias cópias idênticas ligadas em série.

Local cos: um segmento de 12 nucleótidos de ADN de cadeia simples que existe em ambas as extremidades do genoma de cadeia dupla do bacteriófago lambda.

Supressão: uma mutação na qual um ou mais nucleótidos (sequenciais) desaparecem do genoma.

Eletroporação: a aplicação de impulsos elétricos para aumentar a permeabilidade das membranas celulares.

Gene endógeno: um gene nativo do genoma.

Variação extra-binomial: maior variabilidade das estimativas repetidas de uma proporção da população do que seria de esperar se essa população tivesse uma distribuição binomial.

Mutação por deslocamento: uma mutação genética causada por inserções ou supressões de um número de nucleótidos que não é divisível uniformemente por três dentro de uma sequência de ADN que codifica para uma proteína/péptido.

Inserção: o acréscimo de um ou mais pares de bases de nucleótidos numa sequência de ADN.

Jackpot: um grande número de mutações que surgiram através da expansão clonal de uma única mutação.

Grandes supressões: supressões no ADN auperiores a vários milhares de bases (detetadas de forma eficaz pelos ensaios de seleção Spi $^-$ e do plasmídeo lacZ).

«Colagem»: a ligação covalente de duas extremidades de moléculas de ADN utilizando ligases.

Mitogénio: uma substância química que estimula uma célula a iniciar a divisão celular, desencadeando a mitose (ou seja, a divisão celular).

Gene neutro: um gene que não é afetado pelas pressões seletivas positivas ou negativas.

Empacotamento: a síntese de partículas de fagos infeciosos a partir de uma preparação de proteínas da cápside e da cauda do fago e um concatâmero de moléculas de ADN de fágicas. Geralmente utilizado para empacotar o ADN clonado num vetor lambda (separado por locais cos) em partículas lambda infeciosas.

Eficiência de empacotamento: a eficiência com a qual os bacteriófagos empacotados são recuperados em bactérias hospedeiras.

▼M5

Unidade formadora de placas (pfu): uma medida de números de bacteriófagos viáveis.

Mutação pontual: um termo geral para uma mutação que afeta apenas uma pequena sequência de ADN, incluindo pequenas inserções, supressões e substituições de pares de bases.

Seleção positiva: um método que permite que sobrevivam apenas os indivíduos nos quais se verificaram mutações.

Gene repórter: um gene cujo resultado mutante pode ser facilmente detetado.

Período de amostragem: o final do período, antes do sacrifício, durante o qual a substância química não é administrada e as lesões do ADN não processadas são fixadas em mutações estáveis.

Vetor de transporte: um vetor construído de modo a poder propagar-se em duas espécies hospedeiras diferentes; assim, o ADN inserido num vetor de transporte pode ser testado ou manipulado em dois tipos de células diferentes ou dois organismos diferentes.

Produto químico em estudo: qualquer substância ou mistura estudada utilizando este método de ensaio.

Transgénico: de, relativo a, ou organismo cujo genoma foi modificado através da transferência de um gene ou genes de outras espécies.

▼M7

B.59. SENSIBILIZAÇÃO CUTÂNEA *IN CHEMICO*: ENSAIO DE REATIVIDADE DIRETA DE PÉPTIDOS (DPRA)

INTRODUÇÃO

O presente método de ensaio é equivalente ao *Test Guideline* 442C (2015) da OCDE. Sensibilizante cutâneo é uma substância que provoca reação alérgica por contacto com a pele, conforme a definição do Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos da ONU (GHS) (1) e pelo Regulamento (CE) n.º 1272/2008, relativo à classificação, rotulagem e embalagem de substâncias e misturas ([1]) (CRE). O presente método de ensaio descreve um procedimento *in chemico* (ensaio de reatividade direta de péptidos — DPRA, do inglês *Direct Peptide Reactivity Assay*) a utilizar para a distinção entre sensibilizantes e não-sensibilizantes cutâneos, em conformidade com o GHS da ONU e com o CRE.

Há consenso sobre os principais eventos biológicos subjacentes à sensibilização cutânea. Os conhecimentos atuais sobre os mecanismos químicos e biológicos associados à sensibilização cutânea foram sintetizados na forma de uma via determinante dos efeitos adversos (AOP — *Adverse Outcome Pathway*) (2), desde o evento molecular iniciador, passando pelos eventos intermédios, até ao efeito adverso, designadamente o surgimento de dermatites alérgicas de contacto em seres humanos ou hipersensibilidade de contacto em roedores. Na AOP de sensibilização cutânea, o evento molecular iniciador é constituído pela ligação covalente das substâncias eletrófilas aos centros nucleófilos das proteínas da pele.

A determinação da sensibilização cutânea tem normalmente utilizado animais de laboratório. Os métodos clássicos que utilizam porquinhos-da-índia — ensaio de maximização de Magnusson Kligman com porquinhos-da-índia (GMPT) e ensaio de Buehler (TM B.6 (3)) — estudam as fases de indução e de desencadeamento da sensibilização cutânea. Ganharam também aceitação um ensaio de gânglios linfáticos locais com murídeos (LLNA, TM B. 42 (4)) e duas alterações deste sem recurso a isótopos radioativos — LLNA: DA (TM B.50 (5)) e LLNA: BrdU-ELISA (TM B.51 (6)) —, que determinam exclusivamente a resposta indutiva, uma vez que apresentam vantagem em relação aos ensaios com porquinhos-da-índia no tocante ao bem-estar animal e proporcionam uma medição objetiva da fase de indução da sensibilização cutânea.

Em tempos mais recentes, foram considerados cientificamente válidos para a avaliação do risco de sensibilização cutânea dos produtos químicos métodos de ensaio *in chemico* e *in vitro* de abordagem determinista. Todavia, serão necessárias combinações de métodos de ensaio que não envolvam animais (*in silico*, *in chemico*, *in vitro*), no âmbito de abordagens integradas de ensaio e avaliação (IATA — *Integrated Approaches to Testing and Assessment*), para substituir na íntegra os ensaios com animais utilizados atualmente, devido à abrangência determinista limitada da AOP, no que respeita aos métodos de ensaio atualmente disponíveis sem recurso a animais (2) (7).

Propõe-se o método DPRA para estudar o evento molecular iniciador da sensibilização cutânea, designadamente a reatividade das proteínas, quantificando a reatividade dos produtos químicos em estudo em função de péptidos-modelo sintéticos que contêm lisina ou cisteína (8). Utilizam-se os valores percentuais de consumo da cisteína e da lisina dos péptidos para classificar a substância em uma de quatro categorias de reatividade, de forma a distinguir os sensibilizantes e os não-sensibilizantes cutâneos (9).

([1]) Regulamento (CE) n.º 1272/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16 de dezembro de 2008, relativo à classificação, rotulagem e embalagem de substâncias e misturas, que altera e revoga as Diretivas 67/548/CEE e 1999/45/CE, e altera o Regulamento (CE) n.º 1907/2006 (JO L 353 de 31.12.2008, p. 1).

▼M7

O método DPRA foi avaliado num estudo de validação liderado pelo laboratório de referência da União Europeia para as alternativas à experimentação em animais (EURL ECVAM) e posteriormente objeto de uma análise independente interpares pelo Comité Científico Consultivo do ECVAM (ESAC), sendo considerado cientificamente válido (10) para utilização como IATA para a distinção entre sensibilizantes e não-sensibilizantes cutâneos, com vista à classificação e à rotulagem em matéria de perigos. As referências (11) (12) (13) e (14) apresentam exemplos da utilização de dados DPRA, juntamente com outras informações.

O apêndice I contém definições.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS, APLICABILIDADE E LIMITAÇÕES

A correlação entre a reatividade das proteínas e o potencial de sensibilização cutânea está bem estabelecida — (15) (16) e (17). No entanto, uma vez que a ligação às proteínas representa apenas um evento importante (embora seja o evento molecular iniciador da AOP de sensibilização cutânea), a informação sobre a reatividade das proteínas decorrente dos ensaios e da aplicação de métodos sem ensaios pode não bastar, por si só, para concluir da ausência de potencial de sensibilização cutânea das substâncias químicas. Por conseguinte, os dados obtidos com este método de ensaio devem ser ponderados no contexto de abordagens integradas, como a IATA, e combinados com outras informações complementares, decorrentes, por exemplo, de ensaios *in vitro* respeitantes a outros eventos importantes da AOP de sensibilização cutânea, bem como métodos sem ensaios que incluem a interpolação com base em dados relativos a produtos químicos análogos.

Este método de ensaio, juntamente com outros dados complementares, pode ser utilizado para distinção entre os sensibilizantes cutâneos (categoria 1 do sistema GHS/CRE) e os não-sensibilizantes, no contexto da IATA. Não pode ser utilizado isoladamente, nem para classificar os sensibilizantes cutâneos nas subcategorias 1A e 1B do GHS, nem para estabelecer o potencial de sensibilização no contexto de avaliações de segurança. Todavia, consoante o quadro regulamentar, um resultado positivo com o DPRA pode ser utilizado, por si só, para classificar uma substância na categoria 1 do sistema GHS/CRE.

Demonstrou-se que o método de ensaio DPRA é aplicável em laboratórios com experiência em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O nível de reprodutibilidade das previsões expectáveis para o método de ensaio é da ordem de 85 % a nível intralaboratorial e 80 % a nível interlaboratorial (10). Os resultados obtidos no estudo de validação (18) e os estudos publicados (19) indicam, de forma geral, que a precisão do método para distinguir os sensibilizantes (categoria 1 do GHS/CRE) dos não-sensibilizantes é de 80 % (N=157), sendo a sensibilidade de 80 (88/109) e a especificidade de 77 % (37/48), relativamente aos resultados obtidos com o LLNA. O DPRA é mais suscetível de subprever produtos químicos com potencial baixo a moderado de sensibilização cutânea (subcategoria 1B do GHS/CRE) do que produtos químicos com potencial elevado (subcategoria 1A do GHS/CRE) — (18) e (19). Contudo, os valores de precisão apresentados para o DPRA utilizado de forma independente são meramente indicativos, dado que o método de ensaio deve ser tido em conta em combinação com outras fontes de informação no contexto de uma IATA, em conformidade com o disposto no ponto 9. Além disso, na avaliação de métodos de ensaio de sensibilização cutânea que não utilizem animais, deve ter-se em mente que o método LLNA e outros ensaios com animais podem não refletir de forma adequada a reação da espécie-alvo (a saber, a espécie humana). Com base nos dados globais disponíveis, considera-se o DPRA aplicável a produtos químicos em estudo que abrangem uma grande variedade de grupos funcionais orgânicos, mecanismos de reação, potenciais de sensibilização cutânea (determinados em estudos *in vivo*) e propriedades físico-químicas (8) (9) (10) e (19). No seu conjunto, estas informações indicam a utilidade do DPRA para a identificação de riscos de sensibilização cutânea.

▼M7

O termo «produto químico em estudo» utilizado neste método de ensaio, refere-se ao produto que é objeto do ensaio e não à aplicabilidade do DPRA ao ensaio de substâncias e/ou misturas. O presente método não é aplicável à análise de compostos metálicos, visto saber-se que estes reagem com proteínas por mecanismos que não implicam ligações covalentes. O produto químico em estudo é dissolvido num solvente adequado, de forma a obter-se uma concentração final de 100 mM (ver ponto 18). No entanto, os produtos químicos em estudo que não forem solúveis a esta concentração podem ser ensaiados a concentrações solúveis mais baixas. Nesse caso, um resultado positivo pode, mesmo assim, ser utilizado para apoiar a identificação do produto químico em estudo como sensibilizante cutâneo, mas um resultado negativo não permite chegar a nenhuma conclusão definitiva quanto à ausência de reatividade. Atualmente, dispõe-se de poucas informações sobre a aplicabilidade do método DPRA a misturas de composição conhecida — (18) e (19). O método considera-se, porém, tecnicamente aplicável ao ensaio de substâncias multicomponentes e misturas de composição conhecida (ver ponto 18). Antes da aplicação do método a uma mistura para obter dados com fins regulamentares, importa ponderar se (e, em caso afirmativo, por que motivo) o método pode proporcionar resultados adequados para o efeito. Tais considerações não são necessárias se houver um requisito regulamentar para o ensaio da mistura. O atual modelo de previsão não pode ser utilizado para misturas complexas de composição desconhecida nem para substâncias de composição desconhecida ou variável, produtos de reação complexos ou materiais biológicos (ou seja, substâncias UVCB), devido à razão molar definida entre o produto químico em estudo e o péptido. Para o efeito, terá de ser desenvolvido um novo modelo de previsão baseado num método gravimétrico. Se houver provas de que não é aplicável a outras categorias específicas de produtos químicos, o método de ensaio não deve ser utilizado para essas categorias.

O presente método de ensaio *in chemico* não inclui nenhum sistema metabólico. Os produtos químicos que exigem bioativação enzimática para exercerem o seu potencial de sensibilização cutânea (pro-haptenos) não são detetáveis por este método. Em alguns casos documentados, os produtos químicos que se tornam sensibilizantes após transformação abiótica (pré-haptenos) podem ser corretamente detetados pelo método de ensaio (18). Atendendo ao que precede, os resultados negativos obtidos com o método de ensaio devem ser interpretados no contexto das referidas limitações e à luz de outras fontes de informação no âmbito de uma IATA. Os produtos químicos em estudo que não se liguem ao péptido por ligações covalentes mas promovam a sua oxidação (ou seja, a dimerização da cisteína) podem conduzir a uma eventual sobrestimativa do consumo do péptido, resultando em possíveis resultados positivos falsos e/ou na atribuição de uma classe de reatividade superior (ver pontos 29 e 30).

Como já referido, o método DPRA contribui para distinguir os sensibilizantes dos não-sensibilizantes cutâneos. Pode, todavia, contribuir também para a avaliação do potencial sensibilizante (11), quando utilizado em abordagens integradas, como a IATA. São necessários estudos complementares, de preferência com base em dados humanos, para determinar de que modo os resultados do método DPRA podem ajudar a avaliar o potencial de sensibilização.

PRINCÍPIO DO ENSAIO

O DPRA é um método *in chemico* que quantifica a concentração remanescente de péptido de cisteína ou lisina após 24 horas de incubação com o produto químico em estudo, a 25 ± 2,5 °C. Os péptidos sintéticos contêm fenilalanina (auxiliar da deteção). A concentração relativa dos péptidos é determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com gradiente de eluição e deteção UV a 220 nm. As percentagens de consumo de péptido de cisteína e lisina são calculadas e utilizadas num modelo de previsão (ver ponto 29) que permite atribuir ao produto químico em estudo uma das quatro classes de reatividade utilizadas para distinguir os sensibilizantes dos não-sensibilizantes cutâneos.

▼M7

Antes de passarem a utilizar, por rotina, o método descrito, os laboratórios terão de demonstrar a sua competência técnica, utilizando para o efeito as dez substâncias de referência indicadas no apêndice 2.

PROCEDIMENTO DE ENSAIO

Este método de ensaio baseia-se no protocolo n.º 154 DB-ALM DPRA (20), utilizado no estudo de validação coordenado pelo EURL-ECVAM. Recomenda-se que seja utilizado para aplicação laboratorial. Apresenta-se a seguir uma descrição dos principais componentes e procedimentos do método DPRA. Se se utilizar um sistema diferente de HPLC, é necessário demonstrar a sua equivalência com o sistema validado descrito no protocolo DB-ALM (p. ex., através de ensaios com as substâncias de referência constantes do apêndice 2).

Preparação dos péptidos de cisteína ou lisina

Imediatamente antes de incubação com o produto químico em estudo, preparam-se soluções-mãe de cisteína (Ac-RFAACAA-COOH) e lisina (Ac--RFAAKAA-COOH) que contenham péptidos sintéticos de pureza superior a 85 % e, de preferência, na gama 90-95 %. A concentração final de péptido com cisteína deve ser de 0,667 mM, em tampão de fosfatos a pH 7,5, e a concentração final de péptido de lisina deve ser de 0,667 mM, em tampão de acetato de amónio a pH 10,2. Deve estabelecer-se a sequência das análises por HPLC de modo a que o tempo de análise seja inferior a 30 horas. No sistema de HPLC utilizado no estudo de validação e descrito no presente método de ensaio, podem realizar-se numa única sequência até 26 amostras em análise (produto químico em estudo, amostra de controlo positivo e um número adequado de controlos com solvente, em função do número de solventes utilizados no ensaio, cada um em triplicado). Os replicados analisados na mesma série devem todos utilizar as mesmas soluções-mãe de péptidos de cisteína e lisina. Recomenda-se verificar a solubilidade de cada lote de péptidos antes da sua utilização.

Preparação do produto químico em estudo

Antes do ensaio, deve determinar-se a solubilidade da substância em estudo num solvente adequado, por recurso ao procedimento descrito no protocolo DPRA DB-ALM (20). Um solvente adequado é aquele que dissolve completamente o produto químico em estudo. Uma vez que, no método DPRA, o produto químico em estudo é incubado em grande excesso com os péptidos de cisteína ou lisina, a verificação visual da formação de uma solução límpida é considerada suficiente para determinar que se dissolveram quer o produto químico em causa quer todos os seus componentes (no caso do ensaio de uma substância ou mistura multicomponentes). Os solventes adequados são o acetonitrilo, a água, uma mistura água-acetonitrilo (1:1), o isopropanol, a acetona ou uma mistura acetona-acetonitrilo (1:1). Podem utilizar-se outros solventes, desde que não tenham impacto na estabilidade do péptido, determinada com controlos de referência C (ou seja, amostras constituídas simplesmente pelo péptido dissolvido no solvente adequado; ver o anexo 3). Como última opção, se o produto químico em estudo não for solúvel em nenhum destes solventes, deve tentar-se solubilizá-lo em 300 µl de DMSO e diluir a solução resultante com 2 700 µl de acetonitrilo; se o produto não for solúvel nesta mistura, deve tentar-se solubilizar idêntica quantidade do mesmo em 1 500 µl de DMSO e diluir a solução resultante com 1 500 µl de acetonitrilo. O produto químico em estudo deve ser previamente tarado num frasco de vidro e, imediatamente antes do ensaio, dissolvido num solvente adequado para preparar uma solução 100 mM. No caso das misturas e das substâncias multicomponentes de composição conhecida, deve estabelecer-se um único grau de pureza através do somatório da proporção dos seus componentes (excluindo a água), determinando-se uma única massa molecular aparente tendo em conta as massas moleculares de cada componente na mistura (excluindo a

▼M7

água) e as suas respetivas proporções. A pureza e a massa molecular aparente assim obtidas devem ser utilizadas para calcular a massa de produto químico necessária para preparar uma solução 100 mM. No caso dos polímeros, cuja massa molecular predominante não pode ser determinada, pode ser tida em conta, para preparar uma solução 100 mM, a massa molecular do monómero (ou a massa molecular aparente dos vários monómeros constituintes do polímero). Contudo, ao ensaiar misturas, substâncias multicomponentes ou polímeros de composição conhecida, deve ponderar-se igualmente o ensaio do produto químico puro. No caso dos líquidos, o produto químico deve ser ensaiado sem qualquer diluição prévia, por incubação com os péptidos de cisteína e lisina a uma razão molar de 1:10 e 1:50, respetivamente. No caso dos sólidos, o produto químico em estudo deve ser dissolvido até à máxima concentração solúvel no mesmo solvente utilizado para preparar a solução de concentração aparente 100 mM. Deve então ensaiar-se sem qualquer outra diluição, por incubação com os péptidos de cisteína e lisina a uma razão molar de 1:10 e 1:50, respetivamente. A obtenção de resultados concordantes (reatividade ou não) entre a solução de concentração aparente 100 mM e o produto químico puro deve permitir chegar a uma conclusão definitiva quanto ao resultado.

Preparação das amostras de controlo positivo, referência e coeluição

Como controlo positivo, deve utilizar-se aldeído cinâmico (n.º CAS 104-55-2; grau de pureza ≥ 95 %, de qualidade alimentar) com uma concentração de 100 mM em acetonitrilo. Podem utilizar-se outros controlos positivos adequados, de preferência com valores de consumo numa gama média, se houver dados históricos que permitam definir critérios de aceitação comparáveis. Devem ainda incluir-se na sequência de análise por HPLC controlos de referência (ou seja, amostras que contenham apenas o péptido dissolvido num solvente adequado), utilizadas para verificar a adequação do sistema de HPLC antes da análise (controlos de referência A) e a estabilidade do controlo de referência ao longo do tempo (controlos de referência B), bem como se o solvente utilizado para dissolver o produto químico em estudo não contribui para o consumo de péptidos (controlos de referência C) (ver apêndice 3). O controlo de referência adequado para cada produto químico serve para calcular a percentagem de consumo de péptidos no respeitante a esse produto (ver ponto 26). Deve também incluir-se na sequência um controlo de coeluição, constituído apenas pelo produto químico em estudo, para cada um destes produtos analisados, com vista a detetar a possível coeluição do produto químico com o péptido de lisina ou de cisteína.

Incubação do produto químico em estudo com as soluções de péptidos de cisteína e lisina

As soluções de péptidos de cisteína e lisina devem ser incubadas com o produto químico em frascos de autoamostragem de vidro, nas proporções de 1:10 e 1:50, respetivamente. Se se observar um precipitado imediatamente após a adição da solução do produto químico em estudo à solução de péptidos, devido a uma baixa solubilidade do produto em água, não é possível conhecer com exatidão a quantidade do produto químico em estudo remanescente na solução para reagir com o péptido. Nesse caso, os resultados positivos podem ser aproveitados, mas os resultados negativos são equívocos e devem interpretar-se com os devidos cuidados (ver também o disposto no ponto 11 para o ensaio de produtos químicos insolúveis até uma concentração de 100 mM). A solução de reação deve ser deixada ao abrigo da luz, a 25 ± 2,5 °C durante 24 ± 2 h, antes de realizar a análise por HPLC. Cada produto químico em estudo deve ser analisado em triplicado, para a determinação de ambos os péptidos. As amostras têm de ser inspecionadas visualmente antes da análise por HPLC. Caso se observe a formação de um precipitado ou uma separação de fases, as amostras podem ser centrifugadas a baixa velocidade (100-400 *g*), para depositar o precipitado no fundo do frasco, a título de precaução, uma vez que grandes quantidades de precipitado podem danificar os tubos ou as colunas do sistema de HPLC. Se se observar uma precipitação ou uma separação de fases após o período de incubação, o consumo de péptidos pode ser subestimado, não sendo possível concluir, com certeza suficiente, a ausência de reação, em caso de resultado negativo.

▼M7

Preparação da curva de calibração para HPLC

Deve obter-se uma curva de calibração para os péptidos de cisteína e de lisina. As soluções-padrão de péptidos são preparadas numa solução a 20 % ou 25 % de acetonitrilo e tampão de fosfatos (pH 7,5), no caso do péptido de cisteína, e de tampão de acetato de amónio (pH 10,2), no caso do péptido de lisina. Utilizando diluições-padrão em série da solução-mãe de péptidos (0,667 mM), preparam-se seis soluções de calibração que cubram a gama de 0,534 a 0,0167 mM. Deve também incluir-se na curva de calibração uma amostra em branco do tampão de diluição. As curvas de calibração adequadas devem ter um parâmetro $r^2 > 0,99$.

Preparação e análise por HPLC

Importa verificar a adequação do sistema de HPLC antes de se efetuar a análise. O consumo de péptidos é monitorizado por HPLC associada a um detetor de UV (detetor de fotodíodos ou detetor de absorvância com 220 nm de comprimento de onda fixo). É instalada no sistema de HPLC uma coluna adequada. O dispositivo de HPLC descrito no protocolo validado utiliza uma coluna Zorbax SB-C-18 2,1 mm × 100 mm × 3,5 µm. Com esta coluna de HPLC de fase reversa, o sistema, na sua totalidade, deve ser equilibrado, a 30 °C, com 50 % de fase A (solução aquosa de ácido trifluoroacético a 0,1 % (v/v)) e 50 % de fase B (solução de ácido trifluoroacético em acetonitrilo a 0,085 % (v/v)) durante, pelo menos, 2 horas antes da análise. A análise por HPLC deve utilizar um caudal de 0,35 ml/min e um gradiente linear de 10 % a 25 % de acetonitrilo durante 10 minutos, seguida de um rápido aumento para 90 % de acetonitrilo, com vista a eliminar as outras matérias. Devem injetar-se volumes iguais de cada padrão, amostra e controlo. A coluna deve ser reequilibrada para as condições iniciais a cada 7 minutos, entre as injeções. Caso se utilize uma coluna de HPLC de fase reversa, os parâmetros de ensaio atrás descritos podem ter de ser ajustados para garantir eluição e integração adequadas dos péptidos de cisteína e lisina, ajustamento esse que inclui o volume de injeção, variável consoante o sistema utilizado (normalmente na gama 3-10 µl). Se se utilizar um sistema diferente de HPLC, é essencial demonstrar a sua equivalência com o sistema validado atrás descrito (p. ex., testando as substâncias de referência constantes do apêndice 2). A absorvância é medida a 220 nm. Caso se utilize um detetor de fotodíodos, deve registar-se também a absorvância a 258 nm. Importa salientar que alguns lotes de acetonitrilo podem ter impacto negativo na estabilidade dos péptidos, devendo, por isso, avaliar-se este parâmetro quando se utiliza um novo lote de acetonitrilo. A relação entre a área do pico a 220 nm e a área do pico a 258 nm pode ser utilizada como indicador de coeluição. Em cada amostra, uma relação entre as áreas dos picos compreendida, em média ([1]), entre 90 % e 100 % (90 % < 100 %) constitui um bom indício de que não ocorreu coeluição.

Alguns produtos químicos em estudo podem promover a oxidação do péptido de cisteína. O pico do péptido de cisteína dimerizada pode ser monitorizado visualmente. Caso se afigure ter ocorrido dimerização, esse facto deve ser registado, pois a percentagem de consumo de péptido poderá estar sobrestimada, levando a falsas estimativas de resultados positivos e/ou à atribuição de uma classe de reatividade mais elevada (ver pontos 29 e 30).

A análise por HPLC dos péptidos de cisteína e lisina pode ser realizada simultaneamente (caso se disponha de dois sistemas de HPLC) ou em dias diferentes. Se a análise for realizada em dias diferentes, todas as soluções do produto químico em estudo devem ser preparadas diariamente, para ambos os ensaios. A análise deve ser programada de forma a garantir que a injeção da primeira amostra ocorre 22 a 26 horas após a mistura do produto químico em estudo com a solução de péptido. A sequência das análises por HPLC deve ser estabelecida

([1]) No presente documento, o termo «média» designa a média aritmética.

▼M7

de modo a que o tempo de análise seja inferior a 30 horas. Com a configuração de HPLC utilizada no ensaio de validação e descrita no presente método de ensaio, podem ser analisadas até 26 amostras num único ensaio de HPLC (ver igualmente o ponto 17). O apêndice 3 apresenta um exemplo de sequência da análise por HPLC.

DADOS E RELATÓRIO

Avaliação dos dados

A concentração de péptido de cisteína ou lisina de cada amostra é determinada por fotometria a 220 nm, medindo a área dos picos respetivos (área delimitada pela curva) e calculando a concentração de péptido através da curva de calibração linear derivada dos padrões.

A percentagem de consumo dos péptidos em cada amostra é determinada medindo a área dos picos e dividindo-a pela área média dos picos dos controlos de referência C pertinentes (ver apêndice 3), de acordo com a fórmula que se segue.

$$\textit{de consumo de péptido} = \left[1 - \left(\frac{\textit{Área do pico do péptido na injecção do replicado}}{\textit{Média das áreas dos picos dos péptidos nos controlos de referência C}}\right)\right] \times 100$$

Critérios de aceitação

Para que os resultados de um ensaio sejam considerados válidos, devem ser satisfeitos os seguintes critérios:

a) A curva de calibração deve ter um parâmetro $r^2 > 0{,}99$.

b) A percentagem média de consumo do péptido nos três replicados, para o controlo positivo com aldeído cinâmico, deve situar-se entre 60,8 % e 100 %, no caso do péptido de cisteína, e entre 40,2 % e 69,0 %, no caso do péptido de lisina; o desvio-padrão máximo para os replicados do controlo positivo deve ser < 14,9 %, no caso da percentagem de consumo de cisteína, e < 11,6 %, no caso da percentagem de consumo de lisina, e

c) A concentração média de péptidos nos controlos de referência A deve ser de 0,50 ± 0,05 mM e o coeficiente de variação das áreas dos picos dos péptidos, para os nove controlos de referência B e C em acetonitrilo, deve ser < 15,0 %.

Se uma ou mais destas condições não forem satisfeitas, o ensaio deve ser repetido.

Para que os resultados obtidos com um dado produto químico sejam considerados válidos, devem ser satisfeitos os seguintes critérios:

a) Para os replicados do produto químico em estudo, o desvio-padrão máximo deve ser < 14,9 %, no respeitante à percentagem de consumo de cisteína, e < 11,6 %, no respeitante à percentagem de consumo de lisina,

b) A concentração média de péptidos na solução dos três controlos de referência C no solvente adequado deve ser de 0,50 ± 0,05 mM. Se estes critérios não forem cumpridos, os dados devem ser rejeitados, repetindo-se o ensaio para esse produto químico.

Modelo de previsão

Para cada produto químico em estudo, calcula-se a percentagem média de consumo de cisteína e de lisina. No cálculo dessa média, um consumo negativo é considerado «0» Utilizando o modelo de previsão cisteína 1:10/ lisina 1:50, que consta do quadro 1, utiliza-se o limiar de 6,38 % do consumo médio de péptidos para distinguir os sensibilizadores dos não-sensibilizadores cutâneos, no âmbito da IATA. A aplicação do modelo de previsão para atribuir uma classe de reatividade (baixa, média ou elevada) a um produto químico em estudo pode revelar-se útil na avaliação do potencial de sensibilização do mesmo no quadro da IATA.

▼M7

Quadro 1

Modelo de previsão [1] **cisteína 1:10/ lisina 1:50**

Percentagem média de consumo de cisteína e de lisina	Classe de reatividade	Previsão DPRA [2]
0 % ≤ % média de consumo ≤ 6,38 %	Pouca ou nenhuma reatividade	Negativa
6,38 % < % média de consumo ≤ 22,62 %	Reatividade baixa	Positiva
22,62 % < % média de consumo ≤ 42,47 %	Reatividade moderada	
42,47 % < % média de consumo ≤ 100 %	Reatividade elevada	

[1] Os números referem-se a valores-limiar gerados estatisticamente, e não à precisão da medição.
[2] Deve ser ponderada uma previsão DPRA no âmbito de uma abordagem IATA, em conformidade com os pontos 9 e 12.

Em alguns casos, o produto químico em estudo (substância ou um ou vários componentes de uma substância ou mistura multicomponentes) apresenta uma absorvância significativa a 220 nm e tem o mesmo tempo de retenção do péptido (coeluição). O problema da coeluição pode ser resolvido mediante uma ligeira adaptação do sistema de HPLC, de modo a espaçar os tempos de eluição do produto químico em estudo e do péptido. Se se utilizar um sistema diferente de HPLC para resolver o problema da coeluição, deve demonstrar-se a sua equivalência com o sistema validado (p. ex., testando as substâncias de referência constantes do apêndice 2). Quando ocorre coeluição, o pico do péptido não pode ser integrado, o que torna impossível calcular a percentagem de péptido consumido. Caso se observe coeluição nos ensaios com os péptidos de cisteína e de lisina, as respetivas análises devem ser classificadas como «inconclusivas» Se ocorrer coeluição apenas com o péptido de lisina, pode utilizar-se o modelo de previsão cisteína 1:10 que consta do quadro 2.

Quadro 2

Modelo de previsão [1] **cisteína 1:10**

% de cisteína (cys) consumida	Classe de reatividade	Previsão DPRA [2]
0 % ≤ % de consumo de Cys ≤ 13,89 %	Pouca ou nenhuma reatividade	Negativa
13,89 % < % de consumo de Cys ≤ 23,09 %	Reatividade baixa	Positiva
23,09 % < % de consumo de Cys ≤ 98,24 %	Reatividade moderada	
98,24 % < % de consumo de Cys ≤ 100 %	Reatividade elevada	

[1] Os números referem-se a valores-limiar gerados estatisticamente, e não à precisão da medição.
[2] Deve ser ponderada uma previsão DPRA no âmbito de uma abordagem IATA, em conformidade com os pontos 9 e 12.

Poderá haver casos em que a sobreposição dos tempos de retenção do produto químico em estudo e de péptidos seja incompleta. Nesses casos, as percentagens de consumo de péptido podem ser estimadas e utilizadas no modelo de previsão cisteína 1:10/ lisina 1:50, embora não seja possível atribuir, com precisão, uma classe de reatividade ao produto químico em estudo.

▼M7

Se o resultado for inequívoco, bastará uma única análise por HPLC do péptido de cisteína e de lisina para um dado produto químico em estudo. Contudo, se os resultados forem próximos do limiar utilizado para distinguir os resultados positivos dos negativos (ou seja, se forem pouco conclusivos), pode ser necessário realizar ensaios adicionais. Se a percentagem média de consumo se situar na gama de 3 % a 10 % no caso do modelo de previsão cisteína 1:10/ lisina 1:50, ou na gama de 9 % a 17 % no caso do modelo de previsão cisteína 1:10, deve ponderar-se a realização de uma segunda série de ensaios, bem como de uma terceira, caso se obtenham resultados discordantes nas duas primeiras.

Relatório de ensaio

O relatório do ensaio deve incluir as seguintes informações

Produto químico em estudo

— Substância monocomponente

  — Dados de identificação química, como as denominações IUPAC ou CAS, o(s) número(s) CAS, o código SMILES ou InChI, a fórmula estrutural e/ou outros elementos;

  — Aspeto físico, solubilidade em água, solubilidade em água, massa molecular e outras propriedades físico-químicas relevantes, se conhecidas;

  — Grau de pureza, identidade química das impurezas, conforme adequado e exequível, etc.;

  — Pré-tratamento, se for o caso (aquecimento ou moagem, por exemplo);

  — Concentrações ensaiadas;

  — Condições de armazenagem e de estabilidade, se conhecidas.

— Substância multicomponentes, UVCB e mistura:

  — Caracterização, tanto quanto possível — por exemplo, por identidade química (ver *supra*), pureza, ocorrência quantitativa e propriedades físico-químicas relevantes (ver *supra*) dos componentes, na medida em que estejam disponíveis;

  — Aspeto físico, solubilidade em água, solubilidade em água e outras propriedades físico-químicas relevantes, se disponíveis;

  — Massa molecular, ou massa molecular aparente no caso de misturas/polímeros de composições conhecidas, ou outras informações relevantes para a realização do estudo;

  — Pré-tratamento, se for o caso (aquecimento ou moagem, por exemplo);

  — Concentrações ensaiadas;

  — Condições de armazenagem e de estabilidade, se conhecidas.

Grupos de controlo

— Controlo positivo

  — Dados de identificação química, como as denominações IUPAC ou CAS, o(s) número(s) CAS, o código SMILES ou InChI, a fórmula estrutural e/ou outros elementos;

  — Aspeto físico, solubilidade em água, massa molecular e outras propriedades físico-químicas relevantes, se conhecidas;

  — Grau de pureza, identidade química das impurezas, conforme adequado e exequível, etc.;

▼M7

— Pré-tratamento, se for o caso (aquecimento ou moagem, por exemplo);

— Concentrações ensaiadas;

— Condições de armazenagem e de estabilidade, se conhecidas;

— Referência ao historial dos resultados dos controlos positivos que demonstrem o cumprimento dos critérios de aceitação, se aplicável.

— Solvente/veículo

— Solvente/veículo utilizado e proporção dos seus componentes, se aplicável;

— Dados de identificação química, como as denominações IUPAC ou CAS, o(s) número(s) CAS e/ou outros elementos;

— Grau de pureza, identidade química das impurezas, conforme adequado e exequível, etc.;

— Aspeto físico, massa molecular e outras propriedades físico-químicas relevantes, caso sejam utilizados solventes/veículos diversos dos referidos no método de ensaio, na medida em que essas informações sejam conhecidas;

— Condições de armazenagem e de estabilidade, se conhecidas;

— Justificação da escolha do solvente, para cada produto químico em estudo;

— No respeitante ao acetonitrilo, resultados do ensaio de impacto na estabilidade dos péptidos.

Preparação dos péptidos, do controlo positivo e do produto químico em estudo

— Caracterização das soluções de péptidos (fornecedor, lote, massa exata de péptido, volume adicionado para preparar a solução-mãe);

— Caracterização da solução de controlo positivo (massa exata da substância de controlo positivo, volume adicionado para preparar a solução de ensaio);

— Caracterização das soluções do produto químico em estudo (massa exata do produto, volume adicionado para preparar a solução de ensaio).

Regulação do aparelho e análise por HPLC

— Tipo de aparelho de HPLC, de colunas e pré-colunas, de detetor e de sistema de amostragem automática;

— Parâmetros relevantes para a análise por HPLC, como a temperatura da coluna, os volumes injetados, o caudal e o gradiente.

Adequação do sistema

— Área do pico correspondente aos péptidos, a 220 nm, para cada padrão e controlo de referência A;

— Representação gráfica da curva de calibração linear e indicação do parâmetro r^2;

— Concentração de péptido em cada replicado do controlo de referência A;

— Concentração média de péptidos (mM) nos três controlos de referência A, com os respetivos desvio-padrão e coeficiente de variação;

— Concentração de péptidos nos controlos de referência A e C.

▼M7

Sequência de análise

— No respeitante aos controlos de referência:

  — Área do pico correspondente aos péptidos, a 220 nm, para cada replicado B e C;

  — Área média do pico correspondente aos péptidos, a 220 nm, para os nove controlos de referência B e C em acetonitrilo, com os respetivos desvio-padrão e coeficiente de variação (indicação da estabilidade dos controlos de referência ao longo do tempo de análise);

  — Para cada solvente utilizado, a área média dos picos correspondentes aos péptidos, a 220 nm, para os três controlos de referência C adequados (para o cálculo da percentagem de consumo de péptidos);

  — Para cada solvente utilizado, a concentração de péptidos (mM) dos três controlos de referência C adequados;

  — Para cada solvente utilizado, a concentração média de péptidos (mM) dos três controlos de referência C adequados, com os respetivos desvio-padrão e coeficiente de variação;

— No respeitante ao controlo positivo:

  — Área do pico correspondente aos péptidos, a 220 nm, para cada replicado;

  — Percentagem de consumo de péptido em cada replicado;

  — Percentagem média de consumo de péptidos nos três replicados, com os respetivos desvio-padrão e coeficiente de variação.

— No respeitante a cada produto químico em estudo:

  — Aparência do precipitado na mistura reacional no final do período de incubação, caso ocorra. Indicar se o precipitado foi ressolubilizado ou centrifugado;

  — Ocorrência de coeluição;

  — Descrição de quaisquer outras observações relevantes;

  — Área do pico correspondente aos péptidos, a 220 nm, para cada replicado;

  — Percentagem de consumo de péptido em cada replicado;

  — Percentagem média de consumo de péptidos nos três replicados, com os respetivos desvio-padrão e coeficiente de variação;

  — Percentagem média de consumo de cisteína e lisina;

  — Modelo de previsão utilizado e previsão DPRA.

Avaliação da competência

— Se pertinente, procedimento utilizado a fim de demonstrar a competência do laboratório para a execução do método de ensaio (p. ex., ensaio de substâncias de referência) ou a reprodutibilidade do desempenho do método de ensaio ao longo do tempo.

Discussão dos resultados

— Discussão dos resultados obtidos com o método de ensaio DPRA;

— Discussão dos resultados do método de ensaio no âmbito de IATA, caso existam outras informações relevantes.

Conclusões

▼M7

REFERÊNCIAS

1) Nações Unidas (ONU) (2013). Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos das Nações Unidas (GHS). 5.º edição revista, ONU Nova Iorque e Genebra, 2013. Disponível em: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html

2) OCDE (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Parte 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No. 168, OECD, Paris.

3) Capítulo B.6 do presente anexo: Sensibilização cutânea

4) Capítulo B.42 do presente anexo: Ensaio de gânglios linfáticos locais

5) Capítulo B.50 do presente anexo: Sensibilização cutânea: Ensaio de gânglios linfáticos locais: DA.

6) Capítulo B.51 do presente anexo: Sensibilização cutânea: Ensaio de gânglios linfáticos locais BrdU-ELISA

7) Adler *et al.* (2011). Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. Archives of Toxicology 85:367-485.

8) Gerberick *et al.* (2004). Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. Toxicological Sciences 81:332-343.

9) Gerberick *et al.* (2007). Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: A classification tree model approach. Toxicological Sciences 97:417-427.

10) EC EURL-ECVAM (2013). Recommendation on the Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) for skin sensitisation testing. Disponível em: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-direct-peptide-reactivity-assay-dpra

11) Jaworska *et al.* (2013). Bayesian integrated testing strategy to assess skin sensitization potency: from theory to practice. Journal of Applied Toxicology, publicado em linha, 14 de maio de 2013, DOI: 10.1002/jat.2869.

12) Bauch *et al*. (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potential. Regulatory Toxicology and Pharmacology 63: 489-504.

13) Nukada *et al.* (2013). Data integration of non-animal tests for the development of a test battery to predict the skin sensitizing potential and potency of chemicals. Toxicology *in vitro* 27:609 618.

14) Ball *et al* (2011). Evaluating the sensitization potential of surfactants: integrating data from the local lymph node assay, guinea pig maximization test, and *in vitro* methods in a weight-of-evidence approach. Regulatory Toxicology and Pharmacology 60:389-400.

15) Landsteiner and Jacobs (1936). Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. Journal of Experimental Medicine 64:625-639.

16) Dupuis and Benezra (1982). Allergic contact dermatitis to simple chemicals: a molecular approach. New York & Basel: Marcel Dekker Inc.

17) Lepoittevin *et al.* (1998). Allergic contact dermatitis: the molecular basis. Springer, Berlin.

18) EC EURL ECVAM (2012). Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) Validation Study Report 74pp. Disponível no seguinte endereço: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-direct-peptide-reactivity-assay-dpra

▼**M7**

19) Natsch *et al.* (2013). A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. Journal of Applied Toxicology, publicado em linha, 9 de abril de 2013, DOI:10.1002/jat.2868.

20) DB-ALM (INVITTOX) Protocol 154: Direct Peptide Reactivity assay (DPRA) for skin sensitisation testing 17pp. Disponível no seguinte endereço: http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/

21) OCDE (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Series on Testing and Assessment, No. 34. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, France.

22) FDA (Food and Drug Administration (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation 22pp. Disponível no seguinte endereço: www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidance/ucm070107.pdf — 138

23) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No. 87).

▼M7

Apêndice 1

DEFINIÇÕES

Exatidão: Grau de acordo entre os resultados do método de ensaio e os valores de referência aceites. Constitui uma medida da eficiência do método e um dos aspetos da «adequação». Este termo e o termo «concordância» são muitas vezes utilizados indistintamente para indicar a proporção de resultados corretos do método de ensaio (21).

DOP (via determinante dos efeitos adversos): Sequência de eventos na estrutura de um produto químico em estudo ou grupo de produtos químicos afins, após o evento molecular iniciador, cujo resultado tenha consequências *in vivo* (2).

Curva de calibração: Relação entre a resposta experimental e a concentração analítica de uma determinada substância (também denominada *curva-padrão*).

Produto químico: Substância ou mistura.

Coeficiente de variação: Medida da variabilidade calculada para um grupo de dados relativos a replicados, que se obtém dividindo o desvio-padrão pela média. Pode multiplicar-se por 100 para ser expresso em percentagem.

Perigo: Propriedade intrínseca de um agente ou de uma situação, suscetível de causar efeitos adversos num organismo, sistema ou (sub)população que lhe seja exposto.

IATA (abordagem integrada de ensaio e avaliação): Abordagem estruturada para identificação (potencial) e caracterização (extensão) do perigo e/ou para avaliação da segurança (potencial/extensão e exposição) de um produto químico ou grupo de produtos químicos, que integra e pondera, de forma estratégica, todos os dados pertinentes, com o objetivo de fundamentar uma decisão regulamentar sobre o perigo e/ou risco potencial e/ou a necessidade de realizar ensaios complementares.

Evento molecular iniciador: Perturbação de um sistema biológico, a nível molecular, induzida por produtos químicos, identificada como o evento iniciador de uma via determinante dos efeitos adversos.

Mistura: Mistura ou solução constituída por duas ou mais substâncias que nela não reagem (1).

Substância monocomponente: Substância, definida pela sua composição quantitativa, na qual um dos principais componentes está presente num teor de, pelo menos, 80 % (m/m).

Substância multicomponentes: Substância, definida pela sua composição quantitativa, da qual mais de um dos principais componentes está presente numa concentração $\geq$ 10 % (m/m) e $<$ 80 % (m/m). As substâncias multicomponentes resultam de processos de fabrico. A diferença entre uma mistura e uma substância multicomponentes é que a primeira se obtém misturando duas ou mais substâncias, sem reação química. As substâncias multicomponentes resultam de reações químicas.

Amostra de controlo positiva: Replicado que contém todos os componentes do sistema de ensaio e tratado com uma substância que comprovadamente induz reação positiva. Para que possa determinar-se a variabilidade da reação positiva a esta amostra de controlo ao longo do tempo, essa reação não deve ser excessivamente positiva.

Controlo de referência: Amostra não tratada que contém todos os componentes do sistema de ensaio, incluindo o solvente ou veículo, e é ensaiada, juntamente com as amostras tratadas com o produto químico em estudo e as outras amostras de controlo, para estabelecer a linha de base de reação para as amostras tratadas

▼M7

com o produto químico em estudo, dissolvido no mesmo solvente ou veículo. Quando ensaiada com uma amostra de controlo negativa correspondente, aquela amostra também permite determinar se o solvente ou veículo interage com o sistema de ensaio.

Adequação: Relação do ensaio com o efeito em causa; pertinência e utilidade do ensaio para o fim em vista. Traduz a medida em que o ensaio mede ou prevê corretamente o efeito biológico em causa. A adequação compreende a exatidão (concordância) do método de ensaio (21).

Fiabilidade: Medida em que, utilizando o mesmo protocolo, um método de ensaio pode ser continuadamente reproduzido no mesmo laboratório e em laboratórios diferentes. A fiabilidade é avaliada com base nos valores calculados das reprodutibilidades intralaboratorial e interlaboratorial, bem como da repetibilidade intralaboratorial (21).

Reprodutibilidade: Acordo entre resultados obtidos em ensaios com o mesmo produto químico, utilizando o mesmo protocolo (ver «Fiabilidade») (21).

Sensibilidade: Proporção dos produtos químicos positivos/ativos que são corretamente classificados pelo método de ensaio. Constitui uma medida da exatidão de um método de ensaio cujos resultados sejam estabelecidos em função de categorias e é um aspeto importante a ter em conta na avaliação da adequação do método de ensaio (21).

Especificidade: Proporção dos produtos químicos negativos/inativos que são corretamente classificados pelo método de ensaio. Constitui uma medida da exatidão de um método de ensaio cujos resultados sejam estabelecidos em função de categorias e é um aspeto importante a ter em conta na avaliação da adequação do método de ensaio (21).

Substância: Um elemento químico e os seus compostos no estado natural ou obtidos por qualquer processo de produção, incluindo aditivos necessários para preservar a estabilidade do produto e impurezas derivadas do processo utilizado, mas excluindo solventes que possam ser separados sem afetar a estabilidade da substância nem modificar a sua composição (1).

Adequação do sistema: Determinação do desempenho (p. ex., sensibilidade) dos instrumentos por análise com um padrão de referência, antes da realização de um lote de análises (22).

Produto químico em estudo: Utiliza-se o termo «produto químico em estudo» para designar o produto químico que é objeto do ensaio.

Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos das Nações Unidas (em inglês: *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals* — UN GHS): Sistema que propõe a classificação dos produtos químicos (substâncias e misturas) em função de tipos e níveis normalizados de perigos físicos, sanitários e ambientais e trata ainda dos elementos de comunicação correspondentes, como pictogramas, palavras-sinal, advertências de perigo, recomendações de prudência e fichas de dados de segurança, de modo a transmitir informações sobre os efeitos indesejáveis do produto em causa com vista à proteção das pessoas (empregadores, trabalhadores, transportadores, consumidores, pessoal dos serviços de emergência, etc.) e do ambiente (1).

UVCB: Substâncias de composição desconhecida ou variável, produtos de reação complexos ou materiais biológicos.

Método de ensaio válido: Método de ensaio cuja importância e fiabilidade são consideradas suficientes para um objetivo específico e que se baseia em princípios cientificamente sólidos. Um método de ensaio nunca é válido em sentido absoluto, mas apenas em relação a um determinado objetivo (21).

▼M7

Apêndice 2

SUBSTÂNCIAS PARA A DEMONSTRAÇÃO DE COMPETÊNCIA

Sensibilização cutânea *in chemico*: Ensaio de reatividade direta de péptidos

Antes de utilizarem de forma rotineira o presente método de ensaio, os laboratórios devem demonstrar a sua competência técnica mediante a obtenção dos resultados DPRA previstos para as dez substâncias recomendadas no quadro 1, bem como valores de consumo de cisteína e lisina incluídos na respetiva gama de referência, no respeitante a oito das dez substâncias de referência, para cada péptido. Estas substâncias foram selecionadas de modo a representarem a gama de reações aos riscos de sensibilização da pele. Entre os outros critérios de seleção, contam-se a disponibilidade comercial, a existência de dados de referência *in vivo* de elevada qualidade e de dados *in vitro* obtidos pelo DPRA também de elevada qualidade, e ainda a utilização das substâncias no estudo de validação coordenado pelo EURL ECVAM para demonstrar o êxito da aplicação do método de ensaio nos laboratórios participantes no estudo.

Quadro 1

Substâncias recomendadas para a demonstração de competência técnica com o ensaio de reatividade direta de péptidos

Substâncias para a demonstração de competência	N.º CAS	Estado físico	Previsão *in vivo* ([1])	Previsão DPRA ([2])	Gama ([3]) de percentagens de consumo de péptido de cisteína	Gama ([3]) de percentagens de consumo de péptido de lisina
2,4-Dinitroclorobenzeno	97-00-7	Sólido	Sensibilizante (extremo)	Positiva	90-100	15-45
Oxazolona	15646-46-5	Sólido	Sensibilizante (extremo)	Positiva	60-80	10-55
Formaldeído	50-00-0	Líquido	Sensibilizante (forte)	Positiva	30-60	0-24
Benzilidenoacetona	122-57-6	Sólido	Sensibilizante (moderado)	Positiva	80-100	0-7
Farnesal	19317-11-4	Líquido	Sensibilizante (fraco)	Positiva	15-55	0-25
2,3-Butanodiona	431-03-8	Líquido	Sensibilizante (fraco)	Positiva	60-100	10-45
1-Butanol	71-36-3	Líquido	Não sensibilizante	Negativa	0-7	0-5,5
6-Metilcumarina	92-48-8	Sólido	Não sensibilizante	Negativa	0-7	0-5,5
Ácido lático	50-21-5	Líquido	Não sensibilizante	Negativa	0-7	0-5,5
4-Metoxiacetofenona	100-06-1	Sólido	Não sensibilizante	Negativa	0-7	0-5,5

([1]) As previsões de riscos e de potencial sensibilizante *in vivo* baseiam-se nos dados LLNA (19). O potencial sensibilizante *in vivo* é obtido por aplicação dos critérios propostos pelo ECETOC (23).
([2]) Deve ser ponderada uma previsão DPRA no âmbito de uma abordagem IATA, em conformidade com os pontos 9 e 11.
([3]) Gamas determinadas com base em, pelo menos, 10 valores de consumo produzidos por 6 laboratórios independentes.

▼M7

Apêndice 3

EXEMPLOS DE SEQUÊNCIAS DE ANÁLISE

Padrões de calibração e controlos de referência	STD1 STD2 STD3 STD4 STD5 STD6 Tampão de diluição Controlo de referência A, rep 1 Controlo de referência A, rep 2 Controlo de referência A, rep 3
Controlos de coeluição	Controlo de coeluição 1 para produto químico em estudo 1 Controlo de coeluição 2 para produto químico em estudo 2
Controlos de referência	Controlo de referência B, rep 1 Controlo de referência B, rep 2 Controlo de referência B, rep 3
Primeiro conjunto de replicados	Controlo de referência C, rep 1 Aldeído cinâmico, rep 1 Amostra 1, rep 1 Amostra 2, rep 1
Segundo conjunto de replicados	Controlo de referência C, rep 2 Aldeído cinâmico, rep 2 Amostra 1, rep 2 Amostra 2, rep 2
Terceiro conjunto de replicados	Controlo de referência C, rep 3 Aldeído cinâmico, rep 3 Amostra 1, rep 3 Amostra 2, rep 3
Controlos de referência	Controlo de referência B, rep 4 Controlo de referência B, rep 5 Controlo de referência B, rep 6

Devem incluir-se na sequência de análise três séries de controlos de referência (ou seja, amostras de controlo constituídas apenas pelo péptido dissolvido num solvente adequado):
Controlo de referência A: utilizado para verificar a adequação do sistema de HPLC.
Controlo de referência B: incluído no início e no final da sequência de análise, para verificar a estabilidade dos controlos de referência ao longo da análise.
Controlo de referência C: incluído na sequência de análise para verificar que o solvente utilizado para dissolver o produto químico em estudo não influencia a percentagem de consumo de péptidos.

▼M7

B.60. SENSIBILIZAÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO*: MÉTODO DE ENSAIO ARE-NRF2 LUCIFERASE

INTRODUÇÃO

O presente método de ensaio é equivalente ao *Test Guideline* 442D (2015) da OCDE. Um sensibilizante cutâneo é uma substância que provoca uma reação alérgica por contacto com a pele, conforme as definições do Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos da ONU (GHS) (1) e do Regulamento (CE) n.º 1272/2008, relativo à classificação, rotulagem e embalagem de substâncias e misturas ([1]) (CRE). O presente método de ensaio descreve um procedimento *in vitro* (ensaio ARE-Nrf2 luciferase) a utilizar para a distinção entre os sensibilizantes e os não-sensibilizantes cutâneos, em conformidade com o GHS da ONU (1) e o CRE.

Há consenso sobre os principais eventos biológicos subjacentes à sensibilização cutânea. Os conhecimentos atuais sobre os mecanismos químicos e biológicos associados a sensibilização cutânea foram sintetizados sob a forma de uma via determinante dos efeitos adversos (AOP — *Adverse Outcome Pathway*) (2), desde o evento molecular iniciador, passando pelos eventos intermédios, até ao efeito adverso na saúde, designadamente o surgimento de dermatites alérgicas de contacto nos seres humanos ou hipersensibilidade de contacto em roedores (2) (3). O evento molecular iniciador é constituído pela ligação covalente das substâncias eletrófilas aos centros nucleófilos das proteínas da pele. O segundo evento essencial nesta AOP tem lugar nos queratinócitos e inclui respostas inflamatórias, bem como a expressão de genes associados a vias de sinalização celular específicas, como as vias dependentes do elemento de resposta antioxidante/eletrófilo (ARE — *Antioxidant Response Element*). O terceiro evento essencial é a ativação das células dendríticas, normalmente avaliada com base na expressão de marcadores específicos da superfície celular (quimoquinas e citocinas). O quarto evento essencial consiste na proliferação de células T, que é avaliada indiretamente no ensaio de gânglios linfáticos locais com murídeos (4).

A determinação da sensibilização cutânea tem normalmente utilizado animais de laboratório. Os métodos clássicos que utilizam porquinhos-da-índia — ensaio de maximização de Magnusson Kligman com porquinhos-da-índia (GMPT) e ensaio de Buehler (TM B.6 (5)) — estudam as fases de indução e de desencadeamento da sensibilização cutânea. Um ensaio de gânglios linfáticos locais com murídeos (LLNA) (TM B. 42 (4)) e duas alterações deste sem recurso a isótopos radioativos — LLNA: DA (TM B.50 (5)) e LLNA: BrdU-ELISA (TM B.51 (6)) –, que determinam exclusivamente a resposta indutiva, ganharam também aceitação, pois apresentam vantagens em relação aos ensaios com porquinhos-da-índia, quer em termos de bem-estar animal quer por proporcionarem uma medição objetiva da fase de indução da sensibilização cutânea.

Mais recentemente, para a avaliação do risco de sensibilização cutânea dos produtos químicos, consideraram-se cientificamente válidos métodos de ensaio *in chemico* e *in vitro* de abordagem determinista. Todavia, serão necessárias combinações de métodos de ensaio que não envolvam animais (*in silico*, *in chemico*, *in vitro*), no âmbito de abordagens integradas de ensaio e avaliação (IATA — *Integrated Approaches to Testing and Assessment*), para substituir na íntegra os ensaios com animais utilizados atualmente, devido à abrangência determinista limitada da AOP, no que respeita aos métodos de ensaio atualmente disponíveis sem recurso a animais (2) (3).

O presente método (ensaio ARE-Nrf2 luciferase) tem por objetivo dar resposta ao segundo evento essencial explicado no ponto 2. Verificou-se que os sensibilizantes cutâneos induzem genes regulados pelo elemento de resposta antioxidante (ARE) (8) (9). As moléculas eletrófilas de pequenas dimensões, como os sensibilizantes

([1]) Regulamento (CE) n.º 1272/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16 de dezembro de 2008, relativo à classificação, rotulagem e embalagem de substâncias e misturas, que altera e revoga as Diretivas 67/548/CEE e 1999/45/CE, e altera o Regulamento (CE) n.º 1907/2006 (JO L 353 de 31.12.2008, p. 1).

▼M7

cutâneos, podem agir sobre a proteína sensora Keap1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*): p. ex., por alteração das ligações covalentes do resíduo de cisteína, resultando na sua dissociação relativamente ao fator de transcrição NCR 2 (*Nuclear factor-erythroid 2 fator 2*). O fator Nfr2 dissociado pode então ativar os genes dependentes do ARE, como os genes que codificam os enzimas desintoxicantes da fase II (8) (10) (11).

Atualmente, o único ensaio ARE-Nrf2 luciferase *in vitro* abrangido pelo presente método de ensaio é o ensaio KeratinoSens™, relativamente ao qual foram concluídos estudos de validação (9) (12) (13), seguidos de uma análise independente interpares realizada pelo laboratório de referência da União Europeia para as alternativas à experimentação em animais (EURL ECVAM) (14). O ensaio KeratinoSens™ foi considerado cientificamente válido para utilização no âmbito de IATA, em apoio à distinção entre sensibilizantes e não-sensibilizantes cutâneos, para efeitos de classificação e rotulagem (14). Os laboratórios que desejem aplicar o método de ensaio podem obter a linha celular recombinante utilizada no ensaio KeratinoSens™ estabelecendo um acordo de licença com a entidade que desenvolveu o método (15).

O apêndice 1 contém definições.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS, APLICABILIDADE E LIMITAÇÕES

Uma vez que a ativação da via Keap1-Nrf2-ARE incide apenas no segundo evento essencial da AOP de sensibilização cutânea, as informações provenientes de métodos de ensaio baseados na ativação desta via não serão provavelmente suficientes, por si sós, para se concluir do potencial de sensibilização cutânea dos produtos químicos. Por conseguinte, os dados obtidos com o presente método de ensaio devem ser ponderados no contexto de abordagens integradas, como a IATA, e combinados com outras informações complementares, decorrentes, por exemplo, de ensaios *in vitro* respeitantes a outros eventos importantes da AOP de sensibilização cutânea, bem como métodos sem ensaios que incluem a interpolação com base em dados relativos a produtos químicos análogos. As referências (13) (16) (17) (18) (19) apresentam exemplos para a utilização do método de ensaio ARE-Nrf2 luciferase, juntamente com outras informações.

O presente método de ensaio pode ser utilizado para distinção entre os sensibilizantes cutâneos (categoria 1 do sistema GHS/CRE) e os não-sensibilizantes, no contexto da IATA. Não pode ser utilizado isoladamente, nem para classificar os sensibilizantes cutâneos nas subcategorias 1A e 1B do GHS, nem para estabelecer o potencial de sensibilização no contexto de avaliações de segurança. Todavia, consoante o quadro regulamentar, um resultado positivo pode ser utilizado, por si só, para classificar uma substância na categoria 1 do sistema GHS/CRE.

Com base no conjunto de dados do estudo de validação e dos ensaios internos utilizados para a avaliação independente interpares do método de ensaio, foi demonstrado que o ensaio KeratinoSens™ é aplicável em laboratórios com experiência em culturas celulares. O nível de reprodutibilidade esperado das previsões para o método de ensaio é da ordem de 85 %, tanto a nível intralaboratorial como interlaboratorial (14). A exatidão (77 % — 155/201), a sensibilidade (78 % — 71/91) e a especificidade (76 % — 84/110) do ensaio KeratinoSens™ para distinguir os sensibilizantes cutâneos (a saber, UN GHS/CLP Cat. 1) dos não-sensibilizantes, em comparação com os resultados LLNA, foram calculadas tendo em conta todos os dados apresentados ao EURL ECVAM para avaliação e análise interpares do método de ensaio (14). Estes valores são semelhantes aos recentemente publicados com base em ensaios internos de cerca de

▼M7

145 substâncias (77 % de precisão, 79 % de sensibilidade, 72 % de especificidade) (13). O ensaio KeratinoSens™ é mais suscetível de subprever produtos químicos com potencial de sensibilização cutânea baixo a moderado (subcategoria 1B do GHS/CRE) do que produtos químicos com potencial elevado (subcategoria 1A do GHS/CRE) — (13) e (14). No seu conjunto, estas informações indicam a utilidade do ensaio KeratinoSens™ para identificar riscos de sensibilização cutânea. Contudo, os valores de precisão apresentados para o ensaio KeratinoSens™ utilizado de forma independente são meramente indicativos, dado que o método de ensaio deve ser tido em conta juntamente com outras fontes de informação no contexto de uma IATA, em conformidade com o disposto no ponto 9. Além disso, na avaliação de métodos de ensaio de sensibilização cutânea que não utilizem animais, deve ter-se em mente que o método LLNA e outros ensaios com animais podem não refletir de forma adequada a reação da espécie-alvo (a saber, a espécie humana).

O termo «produto químico em estudo» utilizado neste método de ensaio, refere-se ao produto que é objeto do ensaio e não à aplicabilidade do método ARE-Nrf2 luciferase ao ensaio de substâncias e/ou misturas. Com base nos dados atualmente disponíveis, considera-se o ensaio KeratinoSens™ aplicável a produtos químicos que abrangem uma grande variedade de grupos funcionais orgânicos, mecanismos de reação, potenciais de sensibilização cutânea (determinados com estudos *in vivo*) e propriedades físico-químicas (9) (12) (13) e (14). Testaram-se principalmente substâncias monocomponentes, embora haja dados relativos a ensaios de misturas (20). Considera-se, porém, que o método é tecnicamente aplicável ao ensaio de substâncias e misturas multicomponentes. Contudo, antes da aplicação do método a uma mistura para obter dados com fins regulamentares, importa ponderar se — e, em caso afirmativo, por que motivo — o método pode proporcionar resultados adequados para o efeito. Tais considerações são dispensáveis se houver um requisito regulamentar para o ensaio da mistura. Acresce que, no caso de ensaios de substâncias multicomponentes ou misturas, deve ser tida em conta a possível interferência de componentes citotóxicos com as respostas observadas. O método de ensaio é aplicável a produtos químicos solúveis ou que formem uma dispersão estável (ou seja, um coloide ou uma suspensão em que o produto químico em estudo não precipite nem se separe do solvente em diferentes fases), quer em água quer em DMSO (aplicável a todos os componentes do produto químico em estudo, em caso de ensaio de uma substância multicomponentes ou de uma mistura). Os produtos químicos em estudo que não satisfaçam estas condições à concentração final mais elevada de 2 000 μM (ver ponto 22) podem ser ensaiados a concentrações mais baixas. Nesse caso, os resultados que satisfazem os critérios de positividade descritos no ponto 39 podem continuar a ser utilizados para apoiar a identificação do produto químico em estudo como sensibilizante cutâneo, enquanto um resultado negativo obtido com concentrações < 1 000 μM deve ser considerado inconclusivo (ver modelo de previsão no ponto 39). Em geral, as substâncias com log P não superior a 5 são testadas com êxito, enquanto as substâncias extremamente hidrófobas (log P superior a 7) estão fora do âmbito de aplicabilidade reconhecido do método de ensaio (14). Para substâncias com log P compreendido entre 5 e 7, apenas se dispõe de informações limitadas.

Os resultados negativos devem ser interpretados com cuidado, uma vez que as substâncias que reagem exclusivamente com resíduos de lisina podem produzir esse tipo de resultados no ensaio. Por outro lado, devido à limitada capacidade metabólica da linha celular utilizada (21) e às condições experimentais, os pró-haptenos (produtos químicos que exigem ativação enzimática, através, por exemplo, de enzimas P450) e os pré-haptenos (produtos químicos ativados por auto-oxidação), em especial com uma velocidade de oxidação lenta, podem também produzir resultados negativos. Os produtos químicos em estudo que não atuam como sensibilizantes mas constituem, todavia, fatores de stress químico, podem produzir falsos resultados positivos (14). E nem sempre é possível avaliar devidamente os produtos químicos altamente citotóxicos. Por último, os produtos químicos que interferem com a enzima luciferase podem confundir a atividade desta em ensaios com células, causando inibição aparente ou um aumento de luminescência (22). Foi referida, por exemplo, a interferência de concentrações de fitoestrogénios superiores a 1μM com os sinais de luminescência em outros

▼M7

ensaios de genes repórteres da luciferase, devido à sobreativação do gene repórter (23). Deve, pois, examinar-se cuidadosamente a expressão da luciferase obtida com concentrações elevadas de fitoestrogénios ou de produtos químicos similares suspeitos de produzirem o mesmo tipo de sobreativação do gene repórter da luciferase (23). Se houver provas de que não é aplicável a outras categorias específicas de produtos químicos em estudo, o método de ensaio não deve ser utilizado para essas categorias.

Para além de apoiar a distinção entre sensibilizadores e não-sensibilizadores cutâneos, o ensaio KeratinoSens™, quando utilizado em abordagens integradas, como a IATA, proporciona também informações, em termos de concentração--resposta, suscetíveis de contribuírem para a avaliação do potencial de sensibilização (19). São necessários, contudo, trabalhos complementares, de preferência com base em dados humanos fiáveis, para determinar a forma como os resultados do ensaio KeratinoSens™ podem contribuir para a avaliação do potencial de sensibilização (24) e para a subcategorização dos sensibilizantes em conformidade com o sistema GHS da ONU/CRE.

PRINCÍPIO DO ENSAIO

O método de ensaio ARE-Nrf2 luciferase utiliza uma linha imortalizada de células aderentes derivada de queratinócitos humanos transfetados de forma estável com um plasmídeo selecionável. A linhagem celular contém o gene da luciferase sob controlo transcricional de um promotor constitutivo fundido com um elemento ARE de um gene cuja regulação ascendente por sensibilizantes por contacto seja conhecida (25) (26). O sinal da luciferase reflete a ativação pelos sensibilizantes dos genes endógenos dependentes do Nrf2, tendo sido demonstrada a dependência do sinal da luciferase relativamente à linha celular recombinante do Nrf2 (27). É, assim, possível a medição quantitativa (deteção por luminescência) da indução do gene da luciferase por recurso a substratos de luciferase produtores de luz bem estabelecidos, indicadores da atividade do fator de transcrição do Nrf2 nas células, após exposição a substâncias eletrófilas.

Os produtos químicos em estudo são considerados positivos no ensaio KeratinoSens™ se induzirem de forma estatisticamente significativa a atividade da luciferase acima de um determinado limiar (> 1,5 vezes ou 50 %), abaixo de uma determinada concentração que não afete de forma significativa a viabilidade celular (abaixo de 1 000 μM e a uma concentração à qual a viabilidade celular é superior a 70 %) (9) (12). Para o efeito, determina-se o fator máximo de indução da atividade da luciferase relativamente ao controlo (negativo) com solvente (I_{max}). Além disso, uma vez que as células são expostas a uma série de concentrações dos produtos químicos em estudo, a concentração necessária a uma indução da atividade da luciferase estatisticamente significativa superior ao limiar (valor $EC_{1,5}$) deve ser estimada por interpolação a partir da curva dose-resposta (ver ponto 32 no respeitante aos cálculos). Por último, devem realizar-se, em paralelo, medições de citotoxicidade, para avaliar se os níveis de indução da atividade da luciferase se observam a concentrações subcitotóxicas.

Antes de passarem a utilizar, por rotina, o ensaio ARE-Nrf2 luciferase de acordo com a presente descrição, os laboratórios terão de demonstrar a sua competência técnica, utilizando para o efeito as dez substâncias de referência indicadas no apêndice 2.

Há normas de desempenho (28) destinadas a facilitar a validação de métodos de ensaio ARE-Nrf2 luciferase *in vitro*, novos ou modificados, similares ao ensaio KeratinoSens™ e a permitir a alteração oportuna do presente método de ensaio para a sua inclusão. A aceitação mútua de dados nos termos do acordo da OCDE só poderá ser garantida no caso de métodos de ensaio validados de acordo com as normas de desempenho, se estes métodos tiverem sido revistos e incluídos na correspondente diretriz de ensaio da OCDE.

▼M7

PROCEDIMENTO DE ENSAIO

Atualmente, o único método abrangido pelo presente método de ensaio é o ensaio KeratinoSens™ validado cientificamente (9) (12) (13) (14). Os procedimentos operacionais normalizados (PON) para o ensaio KeratinoSens™ estão disponíveis e devem ser utilizados nas fases de implementação e utilização do método de ensaio no laboratório (15). Os laboratórios que desejem aplicar o método de ensaio podem obter a linha celular recombinante utilizada no ensaio KeratinoSens™ mediante o estabelecimento de um acordo de licença com a entidade que desenvolveu o método. Os pontos que se seguem apresentam uma descrição dos principais componentes e procedimentos do método de ensaio luciferase ARE-Nrf2.

Preparação das culturas de queratinócitos

Deve utilizar-se uma linha celular transgénica com uma inserção estável do gene repórter da luciferase sob o controlo do elemento ARE (p. ex., a linha celular KeratinoSens™). Após a receção, as células são propagadas (p. ex., 2 a 4 passagens) e armazenadas congeladas sob a forma de aglomerado homogéneo. As células provenientes deste aglomerado original podem ser propagadas até um determinado número máximo de passagens (25, no caso do ensaio KeratinoSens™) e são utilizadas para ensaios de rotina, utilizando o meio de manutenção adequado (no caso do ensaio KeratinoSens™, DMEM com soro e Geneticin).

As células utilizadas no ensaio devem ser confluentes a 80-90 %, devendo ter-se o cuidado de garantir que nunca são cultivadas até à confluência total. Na véspera do ensaio, as células são colhidas e distribuídas em placas de 96 poços (10 000 células por poço, no caso do ensaio KeratinoSens™). Deve prestar-se atenção para evitar a sedimentação das células durante a inoculação, com vista a assegurar uma distribuição homogénea do número de células em cada poço — caso contrário, esta etapa pode originar uma grande variabilidade entre poços. Em cada réplica, utilizam-se três replicados para as medições de atividade da luciferase, utilizando um replicado paralelo para o ensaio de viabilidade celular.

Preparação do produto químico em estudo e das substâncias de controlo

O produto químico em estudo e as substâncias de controlo são preparados no dia do ensaio. No ensaio KeratinoSens™, os produtos químicos em estudo são dissolvidos em dimetilssulfóxido (DMSO) até se obter a concentração final pretendida (p. ex., 200 mM). As soluções de DMSO podem ser consideradas autoesterilizantes, pelo que não é necessário esterilizá-las por filtração. Os produtos químicos insolúveis em DMSO são dissolvidos em água esterilizada ou em meio de cultura e as soluções são esterilizadas, nomeadamente por filtração. No caso de produtos químicos que não tenham massa molecular definida, prepara-se uma solução-mãe com concentração por defeito — 40 mg/ml ou 4 % (m/v) — para o ensaio KeratinoSens™. Se se utilizarem solventes diversos do DMSO, da água ou de meio de cultura, deve apresentar-se uma fundamentação científica suficiente.

A partir das soluções-mãe do produto químico em DMSO, efetua-se uma série de diluições com DMSO de forma a obter 12 concentrações de referência do produto (de 0,098 e 200 mM, no ensaio KeratinoSens™), para análise subsequente. No caso de produtos químicos não solúveis em DMSO, as diluições para a obtenção das concentrações de referência são feitas por recurso a água esterilizada ou meio de cultura estéril. Independentemente do solvente utilizado, as concentrações de referência são, por sua vez, diluídas 25 vezes em meio de cultura com soro e finalmente utilizadas para tratamento com um fator de diluição de 4, de modo a que as concentrações finais do produto químico em estudo se situem na gama de 0,98 a 2 000 μM, no ensaio KeratinoSens™. Podem utilizar-se concentrações alternativas, com justificação adequada (p. ex., em caso de citotoxicidade ou de baixa solubilidade).

O controlo negativo (solvente) utilizado no ensaio KeratinoSens™ é o DMSO (n.º CAS 67-68-5, pureza ≥ 99 %), para o qual se preparam seis poços por placa. É objeto das mesmas operações de diluição descritas no ponto 22 para as concentrações de referência, de forma a que a concentração final do controlo negativo (solvente) seja de 1 %, valor que se sabe não afetar a viabilidade celular e

▼M7

que corresponde à concentração de DMSO nos lotes com o produto químico em estudo e no controlo positivo. No caso de produtos químicos não solúveis em DMSO, cujas diluições são efetuadas em água, a concentração de DMSO em todos os poços da solução de ensaio final deve ser ajustada para 1 %, tal como para os restantes produtos químicos em estudo e substâncias de controlo.

O controlo positivo utilizado no ensaio KeratinoSens™ é o aldeído cinâmico (n.º CAS 14371-10-9, pureza ≥ 98 %), do qual se prepara uma série de 5 concentrações de referência na gama de 0,4 a 6,4 mM em DMSO (a partir de uma solução-mãe a 6,4 mM), diluídas do modo descrito para as concentrações de referência no ponto 22, de forma a que a concentração final do controlo positivo se situe na gama de 4 a 64 μM. Podem utilizar-se outros controlos positivos adequados, que apresentem, de preferência, valores $EC_{1,5}$ na zona intermédia da gama, caso haja dados históricos que permitam pressupor critérios de aceitabilidade comparáveis.

Aplicação dos produtos químicos em estudo e das substâncias de controlo

No respeitante a cada produto químico em estudo e a cada substância de controlo positivo, é necessário um ensaio para obter uma estimativa (positiva ou negativa); esse ensaio utiliza, pelo menos, duas réplicas independentes, cada uma delas constituída por três replicados (ou seja, n = 6). Em caso de resultados discordantes entre as duas réplicas independentes, deve realizar-se uma terceira réplica com três replicados (ou seja, n = 9). Cada réplica independente é realizada num dia diferente, com uma solução-mãe fresca dos produtos químicos em estudo e células colhidas especificamente. As células podem, contudo, provir da mesma passagem.

Após a inoculação do modo descrito no ponto 20, as células são cultivadas durante 24 horas em placas de microtitulação de 96 poços. O meio é então retirado e substituído por meio de cultura fresco (150 μl de meio de cultura com soro mas sem Geneticin, no caso do ensaio KeratinoSens™), ao qual se adicionam 50 μl do produto químico em estudo e das substâncias de controlo, diluídos 25 vezes. Pelo menos um poço por placa deve ficar vazio (sem células e sem tratamento), para a avaliação das concentrações de fundo.

As placas são, em seguida, incubadas durante 48 horas a 37 ± 1 °C, numa atmosfera com 5 % de CO_2, no ensaio KeratinoSens™. Deve ter-se o cuidado de evitar a evaporação de produtos químicos voláteis, bem como a contaminação cruzada entre poços pelos produtos químicos em estudo (por exemplo, cobrindo as placas com películas antes da incubação com os produtos).

Medições da atividade da luciferase

Três fatores são essenciais para garantir leituras adequadas da luminescência:

— escolha de um luminómetro sensível,

— utilização de placas com altura suficiente para evitar a contaminação cruzada pela luz; e

— utilização de um substrato de luciferase com luminosidade adequada, para garantir sensibilidade suficiente e baixa variabilidade.

Antes do ensaio, importa realizar um ensaio de controlo do modo descrito no apêndice 3, para garantir que são satisfeitas as três condições.

Após as 48 horas de exposição do produto químico em estudo e das substâncias de referência no ensaio KeratinoSens™, as células são lavadas com um tampão salino de fosfatos, adicionando-se a cada poço, durante 20 minutos, à temperatura ambiente, o tampão de lise adequado para as leituras de luminescência.

▼M7

As placas com os lisados de células são então colocadas no luminómetro para leitura. No ensaio KeratinoSens™, a programação é a seguinte: i) adiciona-se o substrato de luciferase a cada poço (50 µl); ii) espera-se 1 segundo; iii) integra-se a atividade da luciferase durante 2 segundos. Devem justificar-se quaisquer condições alternativas a que eventualmente se recorra (p. ex., em função do modelo de luminómetro utilizado). Pode também utilizar-se um substrato luminescente que satisfaça os requisitos de controlo de qualidade descritos no apêndice 3.

Avaliação da citotoxicidade

No ensaio de viabilidade celular KeratinoSens™, o meio é substituído, após as 48 horas de exposição, por um meio fresco que contém MTT [brometo de 3-(4,5--dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio; n.º CAS 298-93-1] e células incubadas durante 4 horas a 37 °C, numa atmosfera com 5 % de CO_2. O meio com MTT é seguidamente retirado e as células são lisadas de um dia para o outro (p. ex., adicionando a cada alvéolo uma solução de SDS a 10 %). Após agitação, mede-se a absorção a 600 nm com um fotómetro.

RESULTADOS E RELATÓRIO

Avaliação dos resultados

No ensaio KeratinoSens™, calculam-se os seguintes parâmetros:

— valor máximo médio de indução da atividade da luciferase (I_{max}) observada para cada concentração do produto químico em estudo e do controlo positivo;

— valor de $EC_{1,5}$, que representa a concentração à qual a indução de atividade da luciferase é superior ao limiar de 1,5 vezes (isto é, aumento de 50 % da atividade da luciferase); e

— as concentrações IC_{50} e IC_{30} correspondentes a uma redução da viabilidade celular de 50 % e 30 %, respetivamente.

— A equação 1 permite calcular o fator de indução de atividade da luciferase; o fator máximo de indução (I_{max}) é calculado sob a forma de média das réplicas individuais.

Equação 1:

$$Fator\ de\ indução = \frac{(L_{amostra} - L_{branco})}{(L_{solvente} - L_{branco})}$$

em que:

$L_{amostra}$ representa a leitura da luminescência no poço do produto químico em estudo (amostra)

L_{branco} representa a leitura da luminescência no poço que não contém células nem o produto (branco)

$L_{solvente}$ representa a média das leituras da luminescência no poço que contém as células e o controlo negativo (solvente)

O valor $EC_{1,5}$ é calculado por interpolação linear de acordo com a equação 2, sendo o valor $EC_{1,5}$ global calculado como média geométrica das réplicas individuais.

Equação 2:

$$EC1{,}5 = (C_b - C_a) \times \left(\frac{1{,}5 - I_\alpha}{I_b - I_\alpha}\right) + C_\alpha$$

▼M7

em que:

C_a representa a concentração mais baixa, em μM, com indução > 1,5 vezes

C_b representa a concentração mais elevada, em μM, com indução < 1,5 vezes

I_a representa o fator de indução determinado à concentração mais baixa, com indução > 1,5 vezes (média dos três poços de replicados)

I_b representa o fator de indução determinado à concentração mais elevada com indução < 1,5 vezes (média dos três poços de replicados)

A viabilidade é calculada pela equação 3:

Equação 3:

$$Viabilidade = \frac{(V_{amostra} - V_{branco})}{V_{solvente} - V_{branco}} \times 100$$

em que:

$V_{amostra}$ representa a leitura da absorvância do MTT no poço do produto químico em estudo (amostra)

V_{branco} representa a leitura da absorvância do MTT no poço que não contém células nem o produto (em branco)

$V_{solvente}$ representa a média das leituras da absorvância do MTT nos poços que contêm as células e o controlo negativo (solvente)

Os valores EC_{50} e IC_{30} são calculados por interpolação linear de acordo com a equação 4, sendo os valores EC_{50} e IC_{30} globais calculados como médias geométricas das réplicas individuais.

Equação 4:

$$IC_x = (C_b - C_a) \times \left(\frac{(100 - x) - V_a}{V_b - V_a}\right) + C_a$$

em que:

X representa a redução percentual da concentração a determinar (50 e 30 para IC_{50} e IC_{30}, respetivamente)

C_a representa a concentração mais baixa, em μM, com redução da viabilidade > x %

C_b representa a concentração mais elevada, em μM, com redução da viabilidade < x %

V_a representa a percentagem de viabilidade à concentração mais baixa, com redução da viabilidade > x %

V_b representa a percentagem de viabilidade à concentração mais elevada, com redução da viabilidade < x %

Para cada concentração com uma indução da atividade da luciferase superior a 1,5 vezes, calcula-se a significância estatística (p. ex., por um teste t-Student bilateral) comparando os valores de luminescência das três amostras de replicados com os valores de luminescência nos poços de controlo negativo (solvente), com vista a determinar se a indução de atividade da luciferase é estatisticamente significativa ($p < 0,05$). A concentração mais baixa com indução de atividade da luciferase > 1,5 vezes é determinante do valor de $EC_{1,5}$. Em cada caso, verifica-se se este valor é inferior a IC_{30}, o que indica uma redução da viabilidade celular inferior à concentração que determina a $EC_{1,5}$.

▼M7

Recomenda-se que os dados sejam verificados visualmente com o auxílio de gráficos. Caso não se observe uma curva dose-resposta bem definida ou se a curva dose-resposta for bifásica (isto é, ultrapassar duas vezes o limiar de 1,5), a experiência deve ser repetida para verificar se este comportamento é específico do produto químico em estudo ou devido a uma anomalia experimental. Se a resposta bifásica for reprodutível numa experiência independente, deve comunicar-se o valor mais baixo de $EC_{1,5}$ (concentração à qual o limiar de 1,5 é atingido pela primeira vez).

Nos raros casos em que se observe uma indução estatisticamente não significativa superior a 1,5 vezes, seguida de concentração mais elevada com uma indução estatisticamente significativa, os resultados desta última apenas são considerados válidos e positivos se a indução estatisticamente significativa acima do limiar de 1,5 tiver sido obtida para uma concentração não citotóxica.

Por último, no ensaio de produtos químicos em estudo que produzam uma indução igual ou superior a 1,5 vezes à concentração de ensaio mais baixa (0,98 μm), o valor de $EC_{1,5} < 0,98$ é estabelecido com base na inspeção visual da curva dose-resposta.

Critérios de aceitação

Ao utilizar o ensaio KeratinoSens™, importa cumprir os critérios de aceitação que se seguem. Em primeiro lugar, a indução da atividade da luciferase obtida com o controlo positivo (aldeído cinâmico) deve ser estatisticamente significativa acima do limiar de 1,5 (p. ex., recorrendo a um teste t) em, pelo menos, uma das concentrações de ensaio (de 4 a 64 μM).

Em segundo lugar, o valor de $EC_{1,5}$ deve situar-se no intervalo de dois desvios-padrão da média histórica do laboratório de ensaio (p. ex., entre 7 μM e 30 μM, de acordo com o conjunto de dados de validação), a atualizar regularmente. Além disso, a indução média nos três replicados de aldeído cinâmico a 64 μM deve situar-se entre 2 e 8. Se este critério não for preenchido, a relação dose-resposta do aldeído cinâmico deve ser cuidadosamente verificada, podendo os ensaios ser aceites apenas se existir uma relação clara dose-resposta com um aumento de indução da atividade da luciferase em função das concentrações, no controlo positivo.

Por último, o coeficiente de variação médio da leitura de luminescência para o controlo negativo (solvente) — DMSO — deve ser inferior a 20 % em cada réplica, constituída por 6 poços testados em triplicado. Se a variabilidade for mais elevada, há que descartar os resultados.

Interpretação dos resultados e modelo de previsão

No ensaio KeratinoSens™, considera-se positiva uma previsão se forem satisfeitas as quatro condições que se seguem em 2 réplicas de 2 ou de 3; caso contrário, a previsão é considerada negativa (figura 1):

1. I_{max} superior a 1,5 vezes e significativamente diferente, do ponto de vista estatístico, do controlo negativo (solvente), de acordo com um teste t-Student bilateral não emparelhado;

2. Viabilidade celular superior a 70 % à concentração mais baixa com indução de atividade da luciferase superior a 1,5 vezes (ou seja, à concentração determinante da $EC_{1,5}$);

3. $EC_{1,5}$ inferior a 1 000 μM (ou inferior a 200 μg/ml, no caso de produtos químicos em estudo sem massa molecular definida);

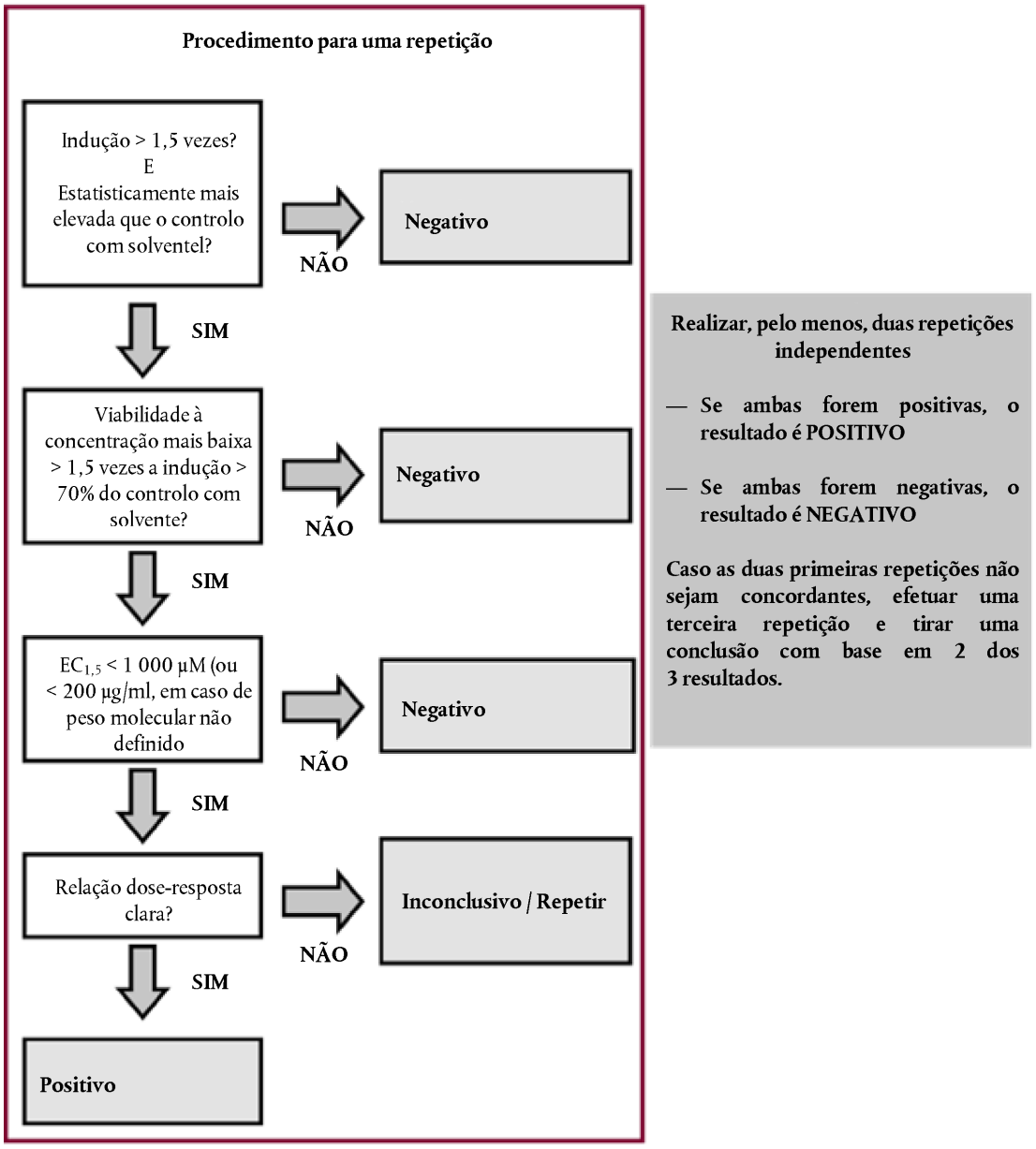
4. Observa-se, de modo geral, uma relação dose-resposta aparente para a indução da luciferase (ou uma resposta bifásica, como referido no ponto 33).

▼M7

Se, numa determinada réplica, as três primeiras condições se encontrarem preenchidas mas não se observar uma relação clara dose-resposta para a indução da luciferase, o resultado dessa réplica deve ser considerado inconclusivo, podendo ser necessário realizar outros ensaios (figura 1). Deve também ser considerado inconclusivo um resultado negativo obtido com concentrações < 1 000 µM (ou < 200 µg/ml no caso de produtos químicos em estudo sem massa molecular definida) (ver ponto 11).

Figura 1

Modelo de previsão utilizado no ensaio KeratinoSens™. Uma previsão KeratinoSens™ deve ser ponderada no âmbito de uma abordagem IATA, em conformidade com os pontos 9 e 11.



Em certos casos raros, os produtos químicos em estudo que induzem a atividade da luciferase a níveis muito próximos dos níveis citotóxicos podem, em algumas réplicas, revelar-se positivos a níveis não citotóxicos (ou seja, $EC_{1,5}$, que determina a concentração inferior a IC_{30}) e, em outras réplicas, apenas a níveis citotóxicos (ou seja, $EC_{1,5}$, que determina a concentração superior a IC_{30}). Esses

▼M7

produtos químicos devem ser sujeitos a novo ensaio, com uma análise dose-resposta mais estrita, utilizando um fator de diluição inferior [p. ex., um fator de diluição entre poços de 1,33 ou Ö2 (= 1,41) vezes], para averiguar a eventual ocorrência de indução a níveis citotóxicos (9).

Relatório de ensaio

Elementos a incluir no relatório de ensaio:

Produto químico em estudo

— Substância monocomponente

  — Dados de identificação química, como as denominações IUPAC ou CAS, o(s) número(s) CAS, o código SMILES ou InChI, a fórmula estrutural e/ou outros elementos;

  — Aspeto físico, solubilidade em água e em DMSO, massa molecular e outras propriedades físico-químicas relevantes, se conhecidas;

  — Grau de pureza, identidade química das impurezas (conforme adequado e exequível), etc.;

  — Pré-tratamento, se for o caso (aquecimento ou moagem, por exemplo);

  — Concentração(ões) ensaiada(s);

  — Condições de armazenagem e de estabilidade, se conhecidas.

— Substância multicomponentes, UVCB e mistura:

  — Caracterização, tanto quanto possível — por exemplo, por identidade química (ver *supra*), pureza, ocorrência quantitativa e propriedades físico-químicas relevantes (ver *supra*) dos componentes, na medida em que estejam disponíveis;

  — Aspeto físico, solubilidade em água e em DMSO e outras propriedades físico-químicas relevantes, na medida em que estejam disponíveis;

  — Massa molecular ou, no caso de misturas/polímeros de composições conhecidas, massa molecular aparente, ou outras informações relevantes para a realização do estudo;

  — Pré-tratamento, se for o caso (aquecimento ou moagem, por exemplo);

  — Concentração(ões) ensaiada(s);

  — Condições de armazenagem e de estabilidade, se conhecidas.

Grupos de controlo

— Controlo positivo

  — Dados de identificação química, como as denominações IUPAC ou CAS, o(s) número(s) CAS, o código SMILES ou InChI, a fórmula estrutural e/ou outros elementos de identificação;

  — Aspeto físico, solubilidade em água e em DMSO, massa molecular e outras propriedades físico-químicas relevantes, se conhecidas e se pertinente;

  — Grau de pureza, identidade química das impurezas, conforme adequado e exequível, etc.;

  — Pré-tratamento, se for o caso (aquecimento ou moagem, por exemplo);

  — Concentração(ões) ensaiada(s);

  — Condições de armazenagem e de estabilidade, se conhecidas;

▼M7

— Referência ao historial dos resultados dos controlos positivos que demonstrem o cumprimento dos critérios de aceitação, se aplicável.

— Controlo negativo (veículo)

— Dados de identificação química, como as denominações IUPAC ou CAS, o(s) número(s) CAS e/ou outros elementos;

— Grau de pureza, identidade química das impurezas, conforme adequado e exequível, etc.;

— Aspeto físico, massa molecular e outras propriedades físico-químicas relevantes, caso sejam utilizados controlos negativos/veículos diversos dos referidos no método de ensaio, na medida em que essas informações sejam conhecidas;

— Condições de armazenagem e de estabilidade, se conhecidas;

— Justificação da escolha do solvente, para cada produto químico em estudo.

Condições de realização do ensaio

— Nome e endereço do patrocinador, do laboratório e do diretor do estudo;

— Descrição do método de ensaio utilizado;

— Linha celular utilizada, suas condições de armazenamento e fonte (p. ex., laboratório a partir do qual foi obtida);

— Número de passagens e nível de confluência das células utilizadas no ensaio;

— Método de contagem celular utilizado para a inoculação antes do ensaio e medidas tomadas para assegurar a homogeneidade da distribuição do número de células (ver ponto 20);

— Luminómetro utilizado (p. ex., modelo), incluindo regulações do instrumento, substrato de luciferase utilizado e demonstração de medições de luminescência adequadas com base no ensaio de controlo descrito no apêndice 3;

— Procedimento utilizado a fim de demonstrar a competência do laboratório para executar o método de ensaio (p. ex., ensaio de substâncias de referência) ou a reprodutibilidade do desempenho do método de ensaio ao longo do tempo.

Procedimento de ensaio

— Número de réplicas e replicados utilizados;

— Concentrações do produto químico em estudo, processo de aplicação e tempo de exposição utilizado, se diferente do recomendado;

— Descrição dos critérios de avaliação e de decisão utilizados;

— Descrição dos critérios de aceitação do estudo utilizados;

— Descrição de eventuais modificações na execução do ensaio.

Resultados

— Tabulação dos valores de I_{max}, $EC_{1,5}$ e viabilidade celular (IC_{50}, IC_{30}) obtidos para o produto químico em estudo e para o controlo positivo, em cada réplica, bem como dos valores médios (I_{max}: média; valores de $EC_{1,5}$ e de viabilidade: média geométrica) e desvio-padrão calculado a partir dos dados de todas as réplicas individuais; notação do produto químico em estudo de acordo com o modelo preditivo;

▼M7

— Coeficiente de variação obtido para os valores de luminescência para o controlo negativo em cada experiência;

— Gráfico dose-resposta para a indução de atividade da luciferase e viabilidade celular;

— Descrição de quaisquer outras observações relevantes.

Discussão dos resultados

— Discussão dos resultados obtidos com o ensaio KeratinoSens™;

— Ponderação dos resultados do método de ensaio no âmbito de IATA, caso existam outras informações relevantes.

Conclusões

REFERÊNCIAS

1) Nações Unidas (ONU) (2013). Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos da ONU (GHS), 5.ª edição revista, ONU Nova Iorque e Genebra, 2013. Disponível em: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

2) OCDE (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Parte 1: Scientific Evidence. OECD Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment No. 168. OECD, Paris.

3) Adler S., Basketter D., Creton S., Pelkonen O., van Benthem J., Zuang V., Andersen K.E., Angers-Loustau A., Aptula A., Bal-Price A., Benfenati E., Bernauer U., Bessems J., Bois F.Y., Boobis A., Brandon E., Bremer S., Broschard T., Casati S., Coecke S., Corvi R., Cronin M., Daston G., Dekant W., Felter S., Grignard E., Gundert-Remy U., Heinonen T., Kimber I., Kleinjans J., Komulainen H., Kreiling R., Kreysa J., Leite S.B., Loizou G., Maxwell G., Mazzatorta P., Munn S., Pfuhler S., Phrakonkham P., Piersma A., Poth A., Prieto P., Repetto G., Rogiers V., Schoeters G., Schwarz M., Serafimova R., Tähti H., Testai E., van Delft J., van Loveren H., Vinken M., Worth A., Zaldivar J.M. (2011). Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. Archives of Toxicology 85, 367-485.

4) Capítulo B.42 do presente anexo: *Sensibilização cutânea: ensaio de gânglios linfáticos locais*.

5) Capítulo B.6 do presente anexo: *Sensibilização cutânea*.

6) Capítulo B.50 do presente anexo: *Sensibilização cutânea: ensaio de gânglios linfáticos locais: DA*.

7) Capítulo B.51 do presente anexo: *Sensibilização cutânea: ensaio de gânglios linfáticos locais: BrdU-ELISA*.

8) Natsch A. (2010). The Nrf2-Keap1-ARE Toxicity Pathway as a Cellular Sensor for Skin Sensitizers-Functional Relevance and Hypothesis on Innate Reactions to Skin Sensitizers. Toxicological Sciences 113, 284-292.

9) Emter R., Ellis G., Natsch A. (2010). Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers *in vitro*. Toxicology and Applied Pharmacology 245, 281-290.

10) Dinkova-Kostova A.T., Holtzclaw W.D., Kensler T.W. (2005). The role of Keap1 in cellular protective responses. Chem. Res. Toxicol. 18, 1779-1791.

▼**M7**

11) Kansanen E., Kuosmanen S.M., Leinonen H., Levonen A.L. (2013). The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. Redox Biol. 1(1), 45-49.

12) Natsch A., Bauch C., Foertsch L., Gerberick F., Normann K., Hilberer A., Inglis H., Landsiedel R., Onken S., Reuter H., Schepky A., Emter R. (2011). The intra- and inter-laboratory reproducibility and predictivity of the KeratinoSens assay to predict skin sensitizers *in vitro*: results of a ring-study in five laboratories. Toxicol. *In Vitro* 25, 733-744.

13) Natsch A., Ryan C.A., Foertsch L., Emter R., Jaworska J., Gerberick G.F., Kern P. (2013). A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. Journal of Applied Toxicology, 33, 1337-1352.

14) EURL-ECVAM (2014). Recommendation on the KeratinoSens™ assay for skin sensitisation testing, 42 pp. Disponível no seguinte endereço: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/recommendation-keratinosens-skin-sensitisation.

15) DB-ALM (INVITTOX) (2013) Protocol 155: KeratinoSens™, 17 pp. Disponível no seguinte endereço: http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index

16) Natsch A., Emter R., Ellis G. (2009). Filling the concept with data: integrating data from different *in vitro* and *in silico* assays on skin sensitizers to explore the battery approach for animal-free skin sensitization testing. Toxicol. Sci. 107, 106-121.

17) Ball N., Cagen S., Carrillo J.C., Certa H., Eigler D., Emter R., Faulhammer F., Garcia C., Graham C., Haux C., Kolle S.N., Kreiling R., Natsch A., Mehling A. (2011). Evaluating the sensitization potential of surfactants: integrating data from the local lymph node assay, guinea pig maximization test, and *in vitro* methods in a weight-of-evidence approach. Regul. Toxicol. Pharmacol. 60, 389-400.

18) Bauch C., Kolle S.N., Ramirez T., Eltze T., Fabian E., Mehling A., Teubner W., van Ravenzwaay B., Landsiedel R. (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potentials. Regul. Toxicol. Pharmacol. 63, 489-504.

19) Jaworska J., Dancik Y., Kern P., Gerberick F., Natsch A. (2013). Bayesian integrated testing strategy to assess skin sensitization potency: from theory to practice. J Appl Toxicol. 33, 1353-1364.

20) Andres E., Sa-Rocha V.M., Barrichello C., Haupt T., Ellis G., Natsch A. (2013). The sensitivity of the KeratinoSens™ assay to evaluate plant extracts: A pilot study. Toxicology *In Vitro* 27, 1220-1225.

21) Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. (2013). Xenobiotic metabolizin enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. Arch. Toxicol. 87, 1683-1969.

22) Thorne N., Inglese J., Auld D.S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology. Chemistry and Biology 17, 646-657.

23) OCDE (2012). BG1Luc Estrogen Receptor Transactivation Test Method for Identifying Estrogen Receptor Agonists and Antagonists. OECD Guidelines for Chemical Testing No. 457. OECD, Paris.

24) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No. 87).

25) Gildea L.A., Ryan C.A., Foertsch L.M., Kennedy J.M., Dearman R.J., Kimber I., Gerberick G.F. (2006). Identification of gene expression changes induced by chemical allergens in dendritic cells: opportunities for skin sensitization testing. J. Invest. Dermatol., 126, 1813-1822.

▼**M7**

26) Ryan C.A., Gildea L.A., Hulette B.C., Dearman R.J., Kimber I., Gerberick G.F. (2004). Gene expressing changes in peripheral blood-derived dendritic cells following exposure to a contact allergen. Toxicol. Lett. 150, 301-316.

27) Emter R., van der Veen J.W., Adamson G., Ezendam J., van Loveren H., Natsch A. (2013). Gene expression changes induced by skin sensitizers in the KeratinoSens™ cell line: Discriminating Nrf2-dependent and Nrf2-independent events. Toxicol. *in vitro* 27, 2225-2232.

28) OCDE (2015). Performance Standards for assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitisation ARE-Nrf2 luciferase test methods. OECD Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment N0 213, OECD, Paris.

29) OCDE (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment No.34. OECD, Paris, France.

30) NAFTA (North American Free Trade Agreement) (2012). Technical Working Group on Pesticides — (Quantitative) Structure Activity Relationship ((Q)SAR) Guidance Document. 186 pp. http://www.epa.gov/oppfead1/international/naftatwg/guidance/qsar-guidance.pdf

▼M7

Apêndice 1

DEFINIÇÕES

Exatidão: Grau de acordo entre os resultados do método de ensaio e os valores de referência aceites. Constitui uma medida da eficiência do método e um dos aspetos da «adequação». Este termo e o termo «concordância» são muitas vezes utilizados indistintamente para indicar a proporção de resultados corretos do método de ensaio (29).

AOP (*Adverse Outcome Pathway* — via determinante dos efeitos adversos): Sequência de eventos na estrutura de um produto químico em estudo ou de um grupo de produtos químicos afins, após o evento molecular iniciador, cujo resultado tenha consequências *in vivo* (2).

ARE (*Antioxidant response element*): O elemento de resposta antioxidante (também denominado EpRE — elemento de resposta eletrófila) é um elemento de resposta situado na região promotora a montante de muitos genes citoprotetores e genes da fase II. Quando ativado pelo NFR 2, rege a indução transcricional desses genes.

Produto químico: Substância ou mistura.

Coeficiente de variação: Medida da variabilidade calculada para um grupo de dados relativos a replicados, que se obtém dividindo o desvio-padrão pela média. Pode multiplicar-se por 100 para ser expresso em percentagem.

$EC_{1,5}$: Valor interpolado para a concentração que induz 1,5 vezes a atividade da luciferase.

IC_{30}: Concentração que reduz a viabilidade celular em 30 %.

IC_{50}: Concentração que reduz a viabilidade celular em 50 %.

Perigo: Propriedade intrínseca de um agente ou de uma situação, suscetível de causar efeitos adversos num organismo, num sistema ou numa (sub)população que lhe sejam expostos.

IATA (abordagem integrada de ensaio e avaliação): Abordagem estruturada para a identificação (potencial) e caracterização (extensão) do perigo e/ou para a avaliação da segurança (potencial/extensão e exposição) de um produto químico ou grupo de produtos químicos, que integra e pondera, de forma estratégica, todos os dados pertinentes com o objetivo de fundamentar uma decisão regulamentar sobre o perigo e/ou risco potencial e/ou a necessidade de realizar ensaios complementares.

I_{max}: Fator de indução máxima da atividade da luciferase relativamente ao controlo negativo (solvente), para qualquer concentração do produto químico em estudo.

Keap1: Proteína sensora (*Kelch-like ech-associated Protein 1*) passível de regular a atividade do fator Nrf2. Em condições não induzidas, ativa o fator de transcrição Nrf2, promovendo assim a ubiquitinilação e a degradação proteolítica no proteassoma. A modificação covalente dos resíduos de cisteína reativos da proteína Keap 1 por pequenas moléculas pode conduzir à dissociação do fator Nrf2 da proteína (8) (10) (11).

▼M7

Mistura: Mistura ou solução constituída por duas ou mais substâncias que nela não reagem (1).

Substância monocomponente: Substância, definida pela sua composição quantitativa, da qual um dos principais componentes está presente num teor de, pelo menos, 80 % (m/m).

Substância multicomponentes: Substância, definida pela sua composição quantitativa, da qual mais de um dos principais componentes está presente numa concentração ≥ 10 % (m/m) e < 80 % (m/m). As substâncias multicomponentes resultam de processos de fabrico. A diferença entre uma mistura e uma substância multicomponentes reside em que a primeira se obtém misturando duas ou mais substâncias, sem reação química. As substâncias multicomponentes resultam de reações químicas.

Nrf2 [(*Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*]: Fator de transcrição envolvido no mecanismo da resposta antioxidante. Se não sofrer ubiquitinilação, o fator Nrf2 desenvolve-se no citoplasma e desloca-se para o núcleo, onde se combina o ARE na região promotora a montante de muitos genes citoprotetores, iniciando a transcrição destes (8) (10) (11).

Amostra de controlo positiva: Replicado que contém todos os componentes do sistema de ensaio e foi tratado com uma substância que comprovadamente induz reação positiva. Para que possa determinar-se a variabilidade no tempo da reação a esta amostra de controlo, essa reação não deve ser excessivamente positiva.

Adequação: Relação do ensaio com o efeito em causa; pertinência e utilidade do ensaio para o fim em vista. Traduz a medida em que o ensaio mede ou prevê corretamente o efeito biológico em apreciação. A adequação compreende a exatidão (concordância) do método de ensaio (29).

Fiabilidade: Medida em que, utilizando o mesmo protocolo, um método de ensaio pode ser continuadamente reproduzido no mesmo laboratório e em laboratórios diferentes. A fiabilidade é avaliada com base nos valores calculados das reprodutibilidades intralaboratorial e interlaboratorial, bem como da repetibilidade intralaboratorial (29).

Reprodutibilidade: Acordo entre resultados obtidos em ensaios com o mesmo produto químico, utilizando o mesmo protocolo (ver fiabilidade) (29).

Sensibilidade: Proporção dos produtos químicos positivos/ativos que são corretamente classificados pelo método de ensaio. Constitui uma medida da exatidão de um método de ensaio cujos resultados sejam estabelecidos em função de categorias e é um aspeto importante a ter em conta na avaliação da adequação do método de ensaio (29).

Amostra de controlo do solvente/veículo: Replicado que contém todos os componentes do sistema de ensaio, com exceção do produto químico em estudo, mas incluindo o solvente. É utilizado para definir a base de referência das respostas no respeitante às amostras expostas ao produto químico em estudo dissolvido no mesmo solvente.

Especificidade: Proporção dos produtos químicos negativos/inativos que são corretamente classificados pelo método de ensaio. Constitui uma medida da exatidão de um método de ensaio cujos resultados sejam estabelecidos em função de categorias e é um aspeto importante a ter em conta na avaliação da adequação do método de ensaio (29).

Substância: Um elemento químico ou um composto de um elemento químico no estado natural ou obtido por qualquer processo de produção, incluindo os aditivos necessários para preservar a estabilidade do produto e as impureza derivadas do processo utilizado, mas excluindo qualquer solvente que possa ser separado sem afetar a estabilidade da substância nem modificar a composição desta (1).

▼M7

Produto químico em estudo: O termo «produto químico em estudo» é utilizado para designar o produto químico que é objeto do ensaio.

Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos das Nações Unidas (em inglês: *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals* — UN GHS): Sistema que propõe a classificação dos produtos químicos (substâncias e misturas) em função de tipos e níveis normalizados de perigos físicos, sanitários e ambientais e trata ainda dos correspondentes elementos de comunicação, como pictogramas, palavras-sinal, advertências de perigo, recomendações de prudência e fichas de dados de segurança, de modo a transmitir informações sobre os efeitos indesejáveis do produto em causa, com vista à proteção das pessoas (empregadores, trabalhadores, transportadores, consumidores, pessoal dos serviços de emergência, etc.) e do ambiente (1).

UVCB: Substâncias de composição desconhecida ou variável, produtos de reação complexos ou materiais biológicos.

Método de ensaio válido: Método de ensaio cujas importância e fiabilidade são consideradas suficientes para um objetivo específico e que se baseia em princípios cientificamente sólidos. Um método de ensaio nunca é válido em sentido absoluto, mas apenas em relação a um determinado objetivo (29).

▼M7

Apêndice 2

SUBSTÂNCIAS PARA A DEMONSTRAÇÃO DE COMPETÊNCIA

Sensibilização cutânea *in vitro*: método de ensaio ARE-Nrf2 luciferase

Antes de utilizarem de forma rotineira este método de ensaio, os laboratórios devem demonstrar a sua competência técnica mediante a obtenção, pelo ensaio KeratinoSens™, dos resultados previstos para as dez substâncias recomendadas no quadro 1, bem como dos valores de $EC_{1,5}$ e IC_{50} incluídos na respetiva gama de referência, no respeitante a, pelo menos, oito das dez substâncias de referência. Estas substâncias foram selecionadas de modo a representarem a gama de reações aos riscos de sensibilização da pele. A disponibilidade comercial, a existência de referências *in vivo* de alta qualidade e a existência de dados *in vitro* de alta qualidade, obtidos com o ensaio KeratinoSens™, constituem outros critérios de seleção.

Quadro 1

Substâncias recomendadas para a demonstração de competência técnica com o ensaio KeratinoSens™

Substâncias para a demonstração de competência	N.º CAS	Fase	Previsão *in vivo* (1)	KeratinoSens™ Previsão (2)	$EC_{1,5}$ (μM) Gama de referência (3)	IC_{50} (μM) Gama de referência (3)
Isopropanol	67-63-0	Líquida	Não sensibilizante	Negativa	> 1 000	> 1 000
Ácido salicílico	69-72-7	Sólida	Não sensibilizante	Negativa	> 1 000	> 1 000
Ácido láctico	50-21-5	Líquida	Não sensibilizante	Negativa	> 1 000	> 1 000
Glicerol	56-81-5	Líquida	Não sensibilizante	Negativa	> 1 000	> 1 000
Álcool cinamílico	104-54-1	Sólida	Sensibilizante (fraco)	Positiva	25 – 175	> 1 000
Dimetacrilato de etilenoglicol	97-90-5	Líquida	Sensibilizante (fraco)	Positiva	5 – 125	> 500
2-Mercaptobenzotiazole	149-30-4	Sólida	Sensibilizante (moderado)	Positiva	25 – 250	> 500
Metildibromoglutaronitrilo	35691-65-7	Sólida	Sensibilizante (forte)	Positiva	< 20	20 – 100
Sulfato de 4-metilaminofenol	55-55-0	Sólida	Sensibilizante (forte)	Positiva	< 12,5	20 – 200
2,4-Dinitroclorobenzeno	97-00-7	Sólida	Sensibilizante (extremo)	Positiva	< 12,5	5 – 20

(1) As previsões de riscos e de potencial sensibilizante *in vivo* baseiam-se nos dados LLNA (13). O potencial sensibilizante *in vivo* é obtido por aplicação dos critérios propostos pelo ECETOC (23).

(2) Uma previsão KeratinoSens™ deve ser ponderada no âmbito de uma abordagem IATA, em conformidade com os pontos 9 e 11 do presente método de ensaio.

(3) Com base nos valores históricos observados (12).

▼M7

Apêndice 3

CONTROLO DE QUALIDADE DAS MEDIÇÕES DE LUMINESCÊNCIA

Experiência de base para a otimização das medições de luminescência no ensaio KeratinoSens™

Os três parâmetros que se seguem são essenciais para garantir a obtenção de resultados fiáveis com o luminómetro:

— Sensibilidade suficiente que garanta um nível de base estável nos poços de controlo;

— Ausência de gradiente na placa devido a tempos de leitura longos; e

— Ausência de contaminação luminosa dos poços adjacentes por parte de poços fortemente ativos.

Antes do ensaio, recomenda-se que a realização de medições de luminescência adequadas seja assegurada mediante o ensaio de uma placa de controlo do modo que seguidamente se descreve (análise em triplicado).

Placa para o primeiro ensaio exploratório

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
B	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
C	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
D	**EGDMA 0.98**	**EGDMA 1.95**	**EGDMA 3.9**	**EGDMA 7.8**	**EGDMA 15.6**	**EGDMA 31.25**	**EGDMA 62.5**	**EGDMA 125**	**EGDMA 250**	**EGDMA 500**	**EGDMA 1000**	**EGDMA 2000**
E	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
F	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
G	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
H	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	**CA 4**	**CA 8**	**CA 16**	**CA 32**	**CA 64**	**Branco**

EGDMA = Dimetacrilato de etilenoglicol (n.º CAS: 97-90-5), produto químico fortemente indutor

CA = Aldeído cinâmico, referência positiva (n.º CAS: 104-55-2

A análise de controlo de qualidade deve demonstrar:

— resposta clara à dose na linha D, com I_{max} > 20 vezes a resposta de base (na maioria dos casos, obtêm-se valores de I_{max} entre 100 e 300);

— nenhuma resposta à dose nas linhas C e E (nenhum valor de indução superior a 1,5 — idealmente, não superior a 1,3), devido à possível contaminação luminosa, em especial na vizinhança de poços fortemente ativos na linha EGDMA;

— nenhuma diferença estatisticamente significativa entre as linhas A, B, C, E, F e G (isto é, ausência de gradiente na placa); e

— variabilidade em qualquer das linhas A, B, C, E, F e G, bem como nos poços com DMSO da linha H, inferior a 20 % (ou seja, linha de base estável).

▼M7

B.61. MÉTODO DE ENSAIO DE DIFUSÃO DE FLUORESCEÍNA PARA IDENTIFICAÇÃO DE CORROSIVOS OCULARES E DE IRRITANTES OCULARES SEVEROS

INTRODUÇÃO

Este método de ensaio é equivalente ao *Test Guideline* TG 460 (2012) da OCDE. O método de ensaio de difusão de fluoresceína é um método *in vitro* que pode ser utilizado em determinadas circunstâncias, respeitadas determinadas limitações, para atribuir a produtos químicos (substâncias e misturas) a classificação de corrosivos oculares e de irritantes oculares severos, conforme definição do Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS) da ONU (categoria 1), do Regulamento (CE) n.º 1272/2008, relativo à classificação, rotulagem e embalagem de substâncias e misturas (CRE) ([1]) (categoria 1), e da Agência de Proteção do Ambiente dos E.U.A. (categoria I) (1) (2). Para efeitos do presente método de ensaio, define-se «irritante ocular severo» como sendo um produto químico cuja administração provoca lesões nos tecidos do olho não reversíveis nos 21 dias seguintes ou provoca uma degradação grave da visão e «corrosivo ocular» como sendo um produto químico que provoca lesões irreversíveis nos tecidos do olho. Estes produtos químicos são classificados na categoria 1 do sistema GHS da ONU, na categoria 1 do Regulamento CRE da UE ou na categoria I da Agência de Proteção do Ambiente dos E.U.A.

Embora o método de difusão de fluoresceína não esteja validado para substituir completamente o ensaio ocular *in vivo* no coelho, recomenda-se a sua integração numa estratégia de ensaio sequencial por etapas para classificação e rotulagem normativas. Recomenda-se, portanto, que este método constitua uma etapa inicial de uma abordagem descendente para a identificação de corrosivos oculares e de irritantes oculares severos, concretamente para determinados tipos de produtos químicos (substâncias e misturas hidrossolúveis) (3) (4).

É geralmente aceite que, no futuro previsível, não estará disponível nenhum ensaio de irritação ocular *in vitro* único, alternativo ao ensaio ocular *in vivo* (método de ensaio B.5 (5)), para previsões em toda a gama de irritação que cubram as diferentes classes de produtos químicos. Porém, a combinação de vários métodos de ensaio alternativos no âmbito de uma estratégia sequencial de ensaio (por etapas) pode substituir-se ao ensaio ocular *in vivo* (4). A abordagem descendente (4) destina-se a ser utilizada quando, com base nas informações disponíveis, for previsível que o produto químico tenha elevado potencial irritante.

Com base no modelo de previsão descrito no ponto 35, este método de ensaio pode, dentro do seu domínio de aplicabilidade, identificar produtos químicos corrosivos oculares ou irritantes oculares severos (categoria 1 no sistema GHS da ONU, categoria 1 do sistema CRE da UE, categoria I da Agência de Proteção do Ambiente do E.U.A.) sem necessidade de ensaios complementares. O mesmo sucede em relação às misturas, embora não se tenham utilizado misturas na validação. O método de ensaio de difusão de fluoresceína pode, portanto, ser utilizado para determinar a corrosão e a irritação oculares provocadas por produtos químicos, no âmbito da estratégia sequencial de ensaio referida no método B.5 (5). Todavia, os produtos químicos que o método de ensaio de difusão de fluoresceína não preveja serem corrosivos oculares nem irritantes oculares severos terão de ser ensaiados por um ou mais métodos adicionais (*in vitro* e/ou *in vivo*) capazes de identificar com exatidão: i) falsos negativos de produtos químicos corrosivos oculares ou de irritantes oculares severos no método de ensaio de deteção de fluoresceína (categoria 1 do sistema GHS da ONU, categoria 1 do Regulamento CRE da UE, categoria I da Agência de Proteção do Ambiente dos E.U.A.); ii) produtos químicos não classificados em termos de irritação ou corrosão ocular («nenhuma categoria» no sistema GHS da ONU, nenhuma categoria

([1]) Regulamento (CE) n.º 1272/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16 de dezembro de 2008, relativo à classificação, rotulagem e embalagem de substâncias e misturas, que altera e revoga as Diretivas 67/548/CEE e 1999/45/CE, e altera o Regulamento (CE) n.º 1907/2006 (JO L 353 de 31.12.2008, p. 1).

▼M7

do Regulamento CRE da UE, categoria IV da Agência de Proteção do Ambiente dos E.U.A.); iii) produtos químicos moderada ou ligeiramente irritantes oculares (categorias 2A e 2B do sistema GHS da ONU, categoria 2 do Regulamento CRE da UE, categorias II e III da Agência de Proteção do Ambiente dos E.U.A.).

Na descrição deste método de ensaio, pretende-se explicar o processo utilizado para avaliar o potencial de corrosão ocular ou de irritação ocular severa de um produto químico, medido pela capacidade deste de induzir lesões numa camada epitelial confluente impermeável. A integridade da permeabilidade transepitelial é uma função primordial do epitélio, como sucede na conjuntiva e na córnea. A permeabilidade transepitelial é controlada por diversas junções oclusivas. Estabeleceu-se uma correlação entre o aumento da permeabilidade do epitélio da córnea *in vivo* e o nível de inflamação e de lesões da superfície observado à medida que a irritação ocular evolui.

No método de ensaio de difusão de fluoresceína, medem-se os efeitos tóxicos de uma curta exposição ao produto químico em estudo determinando o aumento de permeabilidade à fluoresceína de sódio através de uma monocamada epitelial de células renais caninas de Madin-Darby (MDCK) cultivadas em insertos permeáveis. A quantidade de fluoresceína que se difunde é proporcional às lesões induzidas pelo produto químico nas ditas junções oclusivas, nos desmossomas e nas membranas celulares, podendo ser utilizada para estimar potenciais de toxicidade ocular de produtos químicos. O apêndice 1 ilustra células MDCK cultivadas na membrana de um inserto para o método de ensaio de difusão de fluoresceína.

Estabelecem-se definições no apêndice 2.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES

Este método de ensaio baseia-se no protocolo INVITTOX n.º 71 (6), que foi avaliado num estudo de validação internacional realizado pelo Centro Europeu de validação de métodos alternativos (*European Centre for the Validation of Alternative Methods*, ECVAM), em colaboração com o ICCVAM (*Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*), dos E.U.A., e com o JaCVAM (*Japanese Center for the Validation of Alternative Methods*), do Japão.

Como o demonstrou o estudo de validação, este método não é recomendado para a identificação de produtos químicos aos quais deva ser atribuída a classificação de irritantes ligeiros ou moderados nem de produtos químicos que não tenham de ser classificados em termos de irritação ocular (substâncias e misturas) — ou seja, produtos químicos das categorias 2A/2B ou «nenhuma categoria» do sistema GHS da ONU, da categoria 2 ou de nenhuma categoria do Regulamento CRE da UE ou das categorias II/III/IV da Agência de Proteção do Ambiente dos E.U.A. (3) (7).

O método de ensaio só é aplicável a produtos químicos (substâncias e misturas) hidrossolúveis. Em geral, o método de difusão de fluoresceína permite prever com exatidão o potencial de irritação ocular severa dos produtos químicos hidrossolúveis e/ou cujo efeito tóxico não seja afetado pela diluição (7). Para que, nas condições experimentais, possa ser considerado hidrossolúvel, o produto químico deve ser solúvel, a concentrações ≥250 mg/ml (uma dose acima do valor-limite de 100 mg/ml), em solução HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution) estéril com cálcio (1,0-1,8 mM) isenta de vermelho de fenol. Todavia, se o produto químico em estudo for solúvel a concentração inferior a 100 mg/ml, mas já induzir difusão de fluoresceína de 20 % a essa concentração (ou seja, DF_{20}< 100 mg/ml), pode ainda ser classificado na categoria 1 do sistema GHS ou na categoria I da EPA.

As limitações identificadas para este método de ensaio excluem do domínio de aplicabilidade ácidos e bases fortes, fixadores celulares e produtos químicos muito voláteis. Estão associados a estes produtos químicos mecanismos que o método de difusão de fluoresceína não mede, designadamente forte coagulação, saponificação ou reações químicas específicas. Os resultados obtidos para produtos químicos corados e viscosos revelam outras limitações da capacidade de previsão deste método (7). É difícil remover produtos químicos de ambos os tipos da monocamada após o curto período de exposição, admitindo-se que a

▼M7

capacidade de previsão do método de ensaio possa melhorar se o número de lavagens for maior. Por outro lado, os produtos químicos sólidos suspensos em líquidos têm tendência a precipitar, podendo ser difícil determinar a concentração final à qual as células são expostas. Excluindo da base de dados os produtos químicos destas classes físico-químicas, aumenta substancialmente a exatidão do método de difusão de fluoresceína nos sistemas de classificação UE, EPA e GHS (7).

Atendendo aos objetivos deste método de ensaio (apenas a identificação de corrosivos oculares e de irritantes oculares severos), as taxas de falsos negativos (ver o ponto 13) não constituem aspeto crítico, porque os produtos químicos que o ensaio considere negativos são seguidamente ensaiados por outros métodos *in vitro* adequadamente validados ou, em derradeira opção, no coelho, conforme as exigências normativas, por recurso a uma estratégia de ensaio sequencial baseada na ponderação da suficiência da prova (5) (ver também os pontos 3 e 4).

Outras limitações identificadas do método de ensaio de difusão de fluoresceína relacionam-se com as taxas de falsos negativos e de falsos positivos. Quando constituiu etapa inicial de uma abordagem descendente para a identificação de substâncias e misturas hidrossolúveis com efeitos corrosivos ou irritantes severos a nível ocular (categoria 1 do sistema GHS da ONU, categoria 1 do Regulamento CRE da UE, categoria I da Agência de Proteção do Ambiente dos E.U.A.), a taxa de falsos positivos do método de difusão de fluoresceína variou entre 7 % (7/103, sistema GHS da ONU e Regulamento CRE da UE) e 9 % (9/99, Agência de Proteção do Ambiente dos E.U.A.) e a taxa de falsos negativos entre 54 % (15/28, Agência de Proteção do Ambiente dos E.U.A.) e 56 % (27/48, sistema GHS da ONU e Regulamento CRE da UE), comparativamente aos resultados *in vivo*. O presente documento não identifica os grupos químicos que geram resultados falsos positivos e/ou falsos negativos no método de ensaio de difusão de fluoresceína.

A cultura de células MDCK tem algumas limitações técnicas próprias. As junções que bloqueiam a passagem do corante fluoresceína de sódio através da monocamada perdem qualidade à medida que aumenta o número de repicagens da cultura celular. Ora, a formação incompleta das junções oclusivas faz aumentar a difusão de fluoresceína nas amostras de controlo (sem o produto químico em estudo). Importa, pois, definir a difusão máxima admissível nas ditas amostras de controlo (ver o ponto 38: difusão de 0 %). Como em todos os ensaios *in vitro*, as células podem sofrer transformações com o tempo, razão pela qual é crucial indicar o número de repicagens correspondente a cada ensaio.

O domínio de aplicabilidade atual poderá ser alargado em determinados casos, mas apenas depois de analisados mais dados relativos a produtos químicos estudados, de preferência resultantes de ensaios (3). Este método de ensaio será atualizado em função dos novos dados e informações que forem sendo examinados.

Os laboratórios que comecem a utilizar este método de ensaio devem recorrer aos produtos químicos para demonstração de competência técnica recomendados no apêndice 3. Antes de apresentarem dados obtidos pelo método de difusão de fluoresceína para efeitos de classificação normativa de perigosidade, os laboratórios podem recorrer aos referidos produtos químicos para comprovar a sua competência técnica na execução deste método.

PRINCÍPIO DO ENSAIO

O método de difusão de fluoresceína é um ensaio *in vitro* de citotoxicidade e de funcionamento celular, realizado numa monocamada confluente de células epiteliais tubulares MDCK CB997 cultivadas em insertos semipermeáveis, as quais representam um modelo do estado não-proliferativo do epitélio da córnea *in vivo*. A linhagem celular MDCK está bem estabelecida e forma junções oclusivas e desmossomas semelhantes aos encontrados no lado apical do epitélio da conjuntiva e da córnea. *In vivo*, esses desmossomas e junções impedem a penetração de solutos e de matérias exógenas no epitélio da córnea. A perda de impermeabilidade transepitelial em consequência de lesões dos desmossomas e das junções oclusivas é um dos primeiros efeitos da irritação ocular induzida por produtos químicos.

▼M7

Aplica-se o produto químico em estudo à camada confluente de células cultivadas no lado apical do inserto. Em geral, a exposição prolonga-se por 1 minuto, para espelhar a velocidade de eliminação normal na exposição humana. Uma das vantagens de um período de exposição curto consiste em as substâncias e misturas em fase aquosa poderem ser ensaiadas tal e qual, se puderem ser facilmente eliminadas depois do período de exposição. Este procedimento permite uma comparação mais direta entre os resultados obtidos e os efeitos do produto químico no ser humano. Em seguida, elimina-se o produto químico em estudo e adiciona-se corante fluoresceína de sódio, não tóxico e com elevada fluorescência, no lado apical da monocamada, mantendo-se o contacto durante 30 minutos. Determinam-se as lesões provocadas pelo produto químico em estudo nas junções oclusivas, quantificando a fluoresceína difundida através da camada celular num período especificado.

Determina-se a quantidade de fluoresceína de sódio que atravessa a monocamada e a membrana do inserto e penetra num dado volume de solução presente no alvéolo para o qual o corante se difunde, medindo por espetrofluorometria a concentração de fluoresceína no alvéolo. Determina-se a quantidade de fluoresceína difundida relativamente às leituras de intensidade de fluorescência correspondentes ao branco de controlo e à amostra de controlo da difusão máxima. Exprime-se a percentagem de difusão e, portanto, a amplitude das lesões causadas nas junções oclusivas, em relação a estas duas amostras de controlo, para cada concentração do produto químico ensaiada. Em seguida, calcula-se o parâmetro DF_{20}, correspondente à concentração que provoca uma variação de 20 % na difusão de fluoresceína relativamente ao valor determinado para a monocamada confluente não exposta ao produto químico em estudo e os insertos sem células. Utiliza-se o valor DF_{20} (mg/ml) no modelo de previsão para identificar os produtos químicos corrosivos e irritantes severos a nível ocular (ver o ponto 35).

A capacidade de recuperação, igualmente avaliada no ensaio de irritação ocular *in vivo*, constitui um aspeto importante do perfil toxicológico do produto químico. A análise preliminar indica que os dados de capacidade de recuperação (até 72 h após a exposição ao produto químico em estudo) poderiam eventualmente melhorar a capacidade de previsão do Protocolo INVITTOX n.º 71. Porém, é necessário explorar melhor este assunto e dispor de mais dados, de preferência provenientes de ensaios complementares (6). Este método de ensaio será atualizado em função dos novos dados e informações que se forem examinando.

PROTOCOLO DE ENSAIO

Preparação da monocamada celular

Prepara-se uma monocamada de células MDCK CB997 utilizando células subconfluentes cultivadas em frascos de cultivo em meio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM)/mistura nutritiva F12 (concentrado × 1 com L-glutamina, tampão HEPES 15 mM, cálcio (1,0 a 1,8 mM) e soro bovino fetal (FCS/FBS) a 10 % inativado pelo calor). Para garantir a formação e a integridade das junções oclusivas, é importante que os meios e soluções utilizados no ensaio de difusão de fluoresceína contenham cálcio em concentração compreendida entre 1,8 mM (200 mg/l) e 1,0 mM (111 mg/l). Para garantir uma formação regular e reprodutível das junções oclusivas, é necessário controlar o número de repicagens. De preferência, as células devem ter sido obtidas após 3 a 30 repicagens a partir de células descongeladas, pois as células nesta gama de número de repicagens têm funcionalidades semelhantes, o que favorece a reprodutibilidade dos resultados dos ensaios.

Antes de se proceder ao ensaio de difusão de fluoresceína, destacam-se as células do frasco por tripsinização, centrifuga-se e inocula-se uma quantidade adequada de células nos insertos inseridos nas placas de 24 alvéolos (ver o apêndice 1). Inoculam-se as células em insertos de 12 mm de diâmetro dotados de uma membrana de ésteres celulósicos mistos, com 80 a 150 μm de espessura e poros de 0,45 μm. No estudo de validação, utilizaram-se insertos Millicell-HA de 12 mm. As propriedades do inserto e o tipo de membrana são importantes, pois podem afetar o crescimento celular e a ligação do produto químico em estudo. Os produtos químicos de certos tipos podem ligar-se à membrana dos insertos Millicell-HA, o que é suscetível de influenciar a interpretação dos resultados. A fim de comprovar a equivalência de outros tipos de membranas eventualmente utilizados, utilizam-se os produtos químicos para demonstração de competência técnica recomendados no apêndice 3.

▼M7

A ligação química à membrana do inserto é mais comum no caso dos compostos catiónicos, como o cloreto de benzalcónio, que são atraídos para a membrana carregada (7). A ligação química à membrana do inserto pode aumentar o período de exposição ao produto químico em estudo, com a consequente sobrestimação do potencial tóxico deste, mas também pode reduzir a difusão de fluoresceína através do inserto, dada a ligação do corante ao composto químico catiónico ligado à membrana do inserto, com a consequente subestimação do potencial tóxico do produto químico em estudo. Para avaliar estes fenómenos, pode expor-se unicamente a membrana à concentração máxima do produto químico em estudo, adicionando em seguida o corante fluoresceína de sódio à concentração normal, durante o período de exposição normal (sem células de controlo). Caso a fluoresceína de sódio se ligue, a membrana do inserto apresentar-se-á amarelada depois da lavagem de eliminação do produto químico. Por conseguinte, é essencial conhecer as propriedades de ligação do produto químico em estudo para interpretar corretamente o efeito deste nas células.

Ao iniciar-se a exposição ao produto químico em estudo, as células inoculadas nos insertos já devem ter formado uma monocamada confluente. Devem ser transferidas para cada inserto $1{,}6 \times 10^5$ células (400 µl de uma suspensão celular de 4×10^5 células/ml). Nestas condições, normalmente obtém-se uma monocamada confluente após 96 horas de cultura. Antes da inoculação, é necessário examinar visualmente os insertos, para garantir que as lesões eventualmente detetadas no exame visual referido no ponto 30 sejam de facto devidas à manipulação dos insertos.

Conservam-se as culturas de células MDCK em incubadores à temperatura de 37±1 °C, numa atmosfera humidificada com 5 % ± 1 % de CO_2. As células devem estar isentas de contaminações por bactérias, vírus, micoplasmas ou fungos.

Aplicação dos produtos químicos em estudo e de controlo

É necessário preparar uma solução de reserva fresca do produto químico em estudo para cada série de ensaios e utilizá-la nos 30 minutos seguintes. Para evitar ligações às proteínas séricas, prepara-se cada produto químico em estudo numa solução HBSS isenta de vermelho de fenol, cuja concentração de cálcio se situe entre 1,0 mM e 1,8 mM. Antes do ensaio, é necessário avaliar a solubilidade do produto químico em estudo em HBSS, à concentração de 250 mg/ml. Se o produto químico em estudo se mantiver em suspensão ou emulsão estável a esta concentração (isto é, mantém-se uma única fase uniforme, sem decantação nem separação de fases) durante 30 minutos, pode utilizar-se o HBSS como solvente. Caso se verifique que o produto químico em estudo é insolúvel em HBSS a esta concentração, será de ponderar o recurso a métodos de ensaio diversos do método de difusão de fluoresceína. Nos casos em que se verifique a insolubilidade do produto químico em HBSS, deve ser-se prudente na utilização de derivados do petróleo leves como solvente, pois os dados disponíveis são insuficientes para se tirarem conclusões sobre o funcionamento do ensaio de difusão de fluoresceína nessas condições.

Preparam-se as seguintes concentrações (massa/volume) de cada produto químico em estudo, em solução HBSS proveniente da solução de reserva (isenta de vermelho de fenol e com concentração de cálcio compreendida entre 1,0 mM e 1,8 mM): 1, 25, 100, 250 mg/ml e uma solução não-diluída ou saturada. Quando o estudo incide num produto químico sólido, deve incluir-se uma concentração muito elevada (750 mg/ml). Esta concentração do produto químico em estudo pode ter de ser aplicada às células por meio de uma pipeta volumétrica. Caso surjam efeitos tóxicos entre 25 mg/ml e 100 mg/ml, será necessário ensaiar duas vezes as seguintes concentrações adicionais: 1, 25, 50, 75 e 100 mg/ml. Cumpridos os critérios de aceitação, determina-se o valor de DF_{20} a partir destas concentrações.

Aplica-se o produto químico em estudo às monocamadas celulares confluentes depois de se retirar o meio de cultura das células e de lavar duas vezes com HBSS tépido (37 °C) esterilizado (isento de vermelho de fenol e com concentração de cálcio compreendida entre 1,0 mM e 1,8 mM). Antes disso, verifica-se visualmente se os filtros têm alguma lesão que pudesse ser indevidamente atribuída a potenciais incompatibilidades com o produto químico em estudo. Devem ser utilizados em cada série de ensaios pelo menos três replicados de cada

▼M7

concentração do produto químico em estudo e de cada amostra de controlo. Após 1 minuto de exposição à temperatura ambiente, remove-se cuidadosamente o produto químico em estudo por aspiração, lava-se a monocamada duas vezes com HBSS tépido (37 °C) esterilizado (isento de vermelho de fenol e com concentração de cálcio compreendida entre 1,0 mM e 1,8 mM) e mede-se imediatamente a difusão de fluoresceína.

Devem ser incluídas em cada série de ensaios as necessárias amostras de controlo negativas (CN) e positivas (CP) correspondentes, para demonstrar que a integridade da monocamada (CN) e a sensibilidade das células (CP) se situam no intervalo histórico de aceitabilidade definido. Sugere-se como amostra de controlo positiva o Brij 35 (n.º CAS 9002-92-0), à concentração de 100 mg/ml. Esta concentração deve gerar uma difusão de fluoresceína (lesão da camada celular) de 30 % (intervalo de aceitabilidade da difusão de fluoresceína: 20-40 %). Para amostra de controlo negativa (branco sem o produto químico em estudo, de controlo), sugere-se HBSS isento de vermelho de fenol e com concentração de cálcio compreendida entre 1,0 mM e 1,8 mM. Para permitir o cálculo dos valores de DF_{20}, deve incluir-se em cada ensaio uma amostra de controlo da difusão máxima. Determina-se a difusão máxima utilizando um inserto de controlo, sem células.

Determinação da permeabilidade à fluoresceína

Imediatamente após a remoção dos produtos químicos em estudo e de controlo, adicionam-se aos insertos (Millicell-HA, por exemplo) 400 µl de solução 0,1 mg/ml de fluoresceína de sódio (0,01 % (m/v) em HBSS isento de vermelho de fenol e com concentração de cálcio compreendida entre 1,0 e 1,8 mM. Mantêm-se as culturas à temperatura ambiente durante 30 minutos. No final do período de incubação com fluoresceína, retiram-se cuidadosamente os insertos de cada alvéolo. Examina-se atentamente cada filtro e registam-se todas as lesões que possam ter sido causadas por manipulações.

Removidos os insertos, determina-se quantitativamente, na solução remanescente nos alvéolos, a fluoresceína que se difundiu através da monocamada e do inserto. Efetuam-se as medições com um espetrofluorímetro aos comprimentos de onda de excitação e de emissão de 485 nm e 530 nm, respetivamente. É necessário regular a sensibilidade do espetrofluorímetro de modo a obter a máxima diferença numérica possível entre a máxima difusão de fluoresceína (insertos sem células) e a difusão de fluoresceína mínima (insertos com exposição da monocamada confluente unicamente à amostra de controlo negativa). Devido às diferenças entre os espetrofluorímetros utilizados, sugere-se a regulação de uma sensibilidade que permita obter uma intensidade de fluorescência superior a 4 000 para a amostra de controlo da difusão máxima de fluoresceína. O valor máximo de difusão de fluoresceína não deve exceder 9 999. A intensidade máxima de difusão de fluoresceína deve estar compreendida na gama de linearidade do espetrofluorímetro utilizado.

Interpretação dos resultados e modelo de previsão

Em termos quantitativos, a difusão de fluoresceína é proporcional às lesões induzidas pelo produto químico nas junções oclusivas. Calcula-se a percentagem de difusão de fluoresceína correspondente a cada concentração do produto químico em estudo a partir dos valores de difusão do corante obtidos para o produto químico em estudo, em termos comparativos relativamente aos valores de difusão de fluoresceína correspondentes à amostra de controlo negativa (leitura correspondente à monocamada confluente de células exposta à amostra de controlo negativa) e a uma amostra de controlo da difusão máxima (leitura correspondente à difusão de fluoresceína através de um inserto desprovido de células).

Valor médio da intensidade de fluorescência correspondente à difusão máxima = x

Valor médio da intensidade de fluorescência correspondente à difusão de 0 % = y

Obtém-se o valor médio correspondente à difusão de 100 % subtraindo ao valor médio correspondente à difusão máxima o valor médio correspondente à difusão de 0 %, ou seja:

$x - y = z$

Obtém-se a percentagem de difusão correspondente a cada dose fixa subtraindo o valor médio correspondente à difusão de 0 % ao valor médio (m) das leituras de intensidade de fluorescência correspondentes aos três replicados e dividindo depois o resultado desta operação pelo valor médio correspondente à difusão de 100 %; ou seja: $\% DF = [(m-y) / z] \times 100\ \%$, em que:

▼M7

m = valor médio das intensidades de fluorescência medidas para os três replicados da concentração em causa,

% DF = percentagem de fluoresceína difundida através da camada celular.

Para calcular a concentração do produto químico que causa uma difusão de fluoresceína de 20 % aplica-se a seguinte equação:

$$DF_D = [(A-B) / (C-B)] \times (M_C - M_B) + M_B$$

em que:

D = percentagem de inibição,

A = percentagem de lesões (difusão de fluoresceína de 20 %),

B = percentagem de difusão de fluoresceína inferior a A,

C = percentagem de difusão de fluoresceína superior a A,

M_C = concentração (mg/ml) correspondente a C,

M_B = concentração (mg/ml) correspondente a B.

Indica-se a seguir o critério-limiar de DF_{20} utilizado para prever propriedades de corrosão ocular ou de irritação ocular severa de produtos químicos:

DF_{20} (mg/ml)	CR no sistema GHS da ONU	CR no Regulamento CRE da UE	CR no sistema da EPA (E.U.A.)
≤ 100	Categoria 1	Categoria 1	Categoria I

CR: classificação e rotulagem.

Recomenda-se o recurso ao método de difusão de fluoresceína unicamente para identificar corrosivos oculares ou irritantes oculares severos que sejam hidrossolúveis (categoria 1 do sistema GHS da ONU, categoria 1 do Regulamento CRE da UE, categoria I da Agência de Proteção do Ambiente dos E.U.A.) (ver os pontos 1 e 10).

Para que possa ser atribuída a um produto químico (substância ou mistura) hidrossolúvel (3) (6) (7) a classificação de «indutor de lesões oculares graves» (categoria 1 do sistema GHS da ONU e também do Regulamento CRE da UE) ou de «corrosivo ocular ou irritante ocular severo» (categoria I da Agência de Proteção do Ambiente dos E.U.A.), o produto químico deve induzir DF_{20} a concentração igual ou inferior a 100 mg/ml.

Aceitação dos resultados

O valor médio correspondente à máxima difusão de fluoresceína (x) deve ser superior a 4 000 (ver o ponto 31); o valor médio correspondente à difusão de fluoresceína de 0 % (y) deve ser igual ou inferior a 300; o valor médio correspondente à difusão de fluoresceína de 100 % (z) deve estar compreendido entre 3 700 e 6 000.

Considera-se o ensaio aceitável se a amostra de controlo positiva gerar na camada celular um nível de lesões compreendido entre 20 % e 40 % (expresso em percentagem de difusão de fluoresceína).

DADOS E RELATÓRIOS

Dados

Para cada série de ensaios, devem ser apresentados num quadro os dados respeitantes a cada alvéolo replicado (por exemplo: valores de intensidade de fluorescência e percentagens de difusão de fluoresceína correspondentes ao produto químico estudado, bem como a respetiva classificação). Devem igualmente ser indicadas as médias ± desvio-padrão das medições correspondentes aos replicados conexos de cada série de ensaios.

▼M7

Relatório do ensaio

Elementos a constar do relatório do ensaio:

Produtos químicos em estudo e de controlo

— Denominação ou denominações químicas, como a denominação estrutural utilizada pelo *Chemical Abstracts Service* (CAS), seguida de outras denominações, se existirem;

— Número de registo CAS do produto químico, se conhecido;

— Grau de pureza e composição da substância ou mistura (em percentagem ponderal), se conhecidas;

— Propriedades físico-químicas (por exemplo: estado físico, volatilidade, pH, estabilidade, hidrossolubilidade, classe química) relevantes para a realização do estudo;

— Tratamento prévio do produto químico em estudo/de controlo, se for o caso (aquecimento ou moagem, por exemplo);

— Condições de armazenagem.

Justificação do método e do protocolo de ensaio utilizados

— Nomeadamente considerações relativas ao domínio de aplicabilidade e às limitações do método de ensaio.

Condições de realização do ensaio

— Descrição do sistema celular utilizado, incluindo o certificado de autenticidade e o estado micoplasmático da linhagem celular;

— Pormenores sobre o protocolo de ensaio seguido;

— Concentração(ões) do produto químico em estudo utilizada(s);

— Tempo de exposição ao produto químico em estudo;

— Duração da incubação com fluoresceína;

— Descrição de eventuais modificações do protocolo do ensaio;

— Descrição dos critérios de avaliação utilizados;

— Referência a dados históricos do modelo (por exemplo: amostras de controlo positivas e negativas e produtos químicos de referência, se for o caso);

— Informações sobre a competência técnica comprovada pelo laboratório.

Resultados

— Quadro dos dados respeitantes ao produto químico em estudo e às amostras de controlo correspondentes a cada série de ensaios e a cada replicado (incluindo cada resultado, os correspondentes valores médios e os respetivos desvios-padrão);

— Classificação(ões) atribuída(s), mencionando o modelo de previsão e/ou os critérios de decisão utilizados;

— Descrição de outros efeitos eventualmente observados.

▼**M7**

Discussão dos resultados

— Deve incluir considerações relativas a eventuais resultados inconclusivos (ponto 35: DF_{20} > 100 mg/ml) e ensaios complementares.

Conclusões

REFERÊNCIAS

1) ONU (2009), Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos da ONU (GHS), terceira edição, revista. Nova Iorque e Genebra, Publicações das Nações Unidas. ISBN: 978-92-1-117006-1. Disponível em: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev03/03files_e.html]

2) U.S. EPA (1996). Label Review Manual, 2.ª edição, EPA737-B-96-001, Washington DC:, Agência de Proteção do Ambiente dos E.U.A.

3) CE-ECVAM (2009). Statement on the scientific validity of cytotoxicity/cell-function based *in vitro* assays for eye irritation testing.

4) Scott, L., *et al.*. (2010). A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace *in vivo* studies using Bottom-Up and Top-Down approaches. *Toxicol. In Vitro*, 24, 1-9.

5) Capítulo B.5 deste anexo, «Irritação/corrosão ocular agudas»

6) CE-ECVAM (1999). INVITOX Protocol 71: Fluorescein Leakage Test. European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM), Ispra, Itália. Disponível em: [http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu

7) CE-ECVAM (2008). Fluorescein Leakage Assay Background Review Document as an Alternative Method for Eye Irritation Testing.

8) OCDE (2005). *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*. OECD Series on Testing and Assessment, No. 34. OCDE, Paris.

▼M7

Apêndice 1

DIAGRAMA DE CÉLULAS MDCK CULTIVADAS NA MEMBRANA DE UM INSERTO PARA O MÉTODO DE ENSAIO DE DIFUSÃO DE FLUORESCEÍNA

Cultiva-se uma camada confluente de células MDCK numa membrana semipermeável de um inserto. Introduzem-se os insertos nos alvéolos de placas de 24 alvéolos.

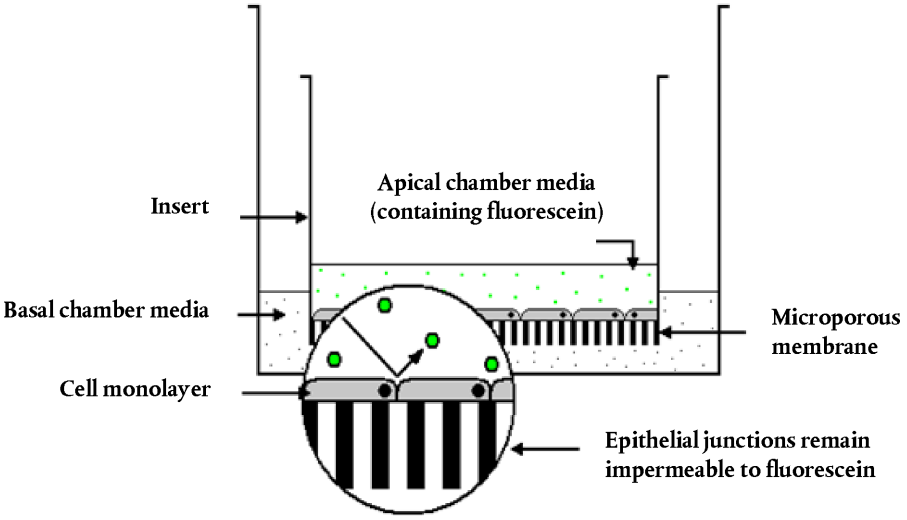


Figura proveniente de: Wilkinson, P.J. (2006). Development of an *in vitro* model to investigate repeat ocular exposure. Ph.D. Thesis, Universidade de Nottingham, Reino Unido.

▼M7

Apêndice 2

DEFINIÇÕES

Exatidão: Grau de acordo entre os resultados do método de ensaio e os valores de referência aceites. Constitui uma medida da eficiência do método e um dos aspetos da «adequação». Este termo e o termo «concordância» são muitas vezes utilizados indistintamente para indicar a proporção de resultados corretos do método de ensaio.

Produto químico: Substância ou mistura.

Categoria I da EPA: Produtos químicos com ação corrosiva (destruição irreversível de tecido ocular) ou de afeção ou irritação da córnea que se mantém durante mais de 21 dias (2).

Regulamento CRE da UE: (Regulamento (CE) n.º 1272/2008, relativo à Classificação, Rotulagem e Embalagem de Substâncias e Misturas): Aplica na União Europeia (UE) o sistema GHS da ONU de classificação de produtos químicos (substâncias e misturas).

Taxa de falsos negativos: Proporção dos produtos químicos positivos que o método de ensaio considera, erradamente, negativos. É um dos indicadores da eficiência dos métodos de ensaio.

Taxa de falsos positivos: Proporção dos produtos químicos negativos que o método de ensaio considera, erradamente, positivos. É um dos indicadores da eficiência dos métodos de ensaio.

DF_{20}: Parâmetro que pode ser estimado determinando a concentração à qual o produto químico em estudo provoca 20 % de difusão de fluoresceína através da camada celular.

Difusão de fluoresceína: Quantidade de fluoresceína que atravessa a camada celular, medida por um método espetrofluorométrico.

Sistema GHS (Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos, da Organização das Nações Unidas — ONU): Sistema que propõe a classificação dos produtos químicos (substâncias e misturas) em função de tipos e níveis normalizados de perigos físicos, sanitários e ambientais e que trata ainda dos elementos de comunicação correspondentes, como pictogramas, palavras-sinal, advertências de perigo, recomendações de prudência e fichas de dados de segurança, de modo a transmitir informações sobre os efeitos indesejáveis do produto em causa com vista à proteção das pessoas (empregadores, trabalhadores, transportadores, consumidores, pessoal dos serviços de emergência etc.) e do ambiente.

Categoria 1 do sistema GHS: Lesão do tecido ocular ou degradação grave da visão em consequência da aplicação do produto químico em estudo na superfície anterior do olho, não totalmente reversível nos 21 dias após a aplicação.

Perigo: Propriedade intrínseca de um agente, ou de uma situação, suscetível de causar efeitos adversos num organismo, sistema ou (sub)população que seja exposto ao agente em causa.

Mistura: No contexto do sistema GHS da ONU, mistura ou solução constituída por duas ou mais substâncias que nela não reagem.

Amostra de controlo negativa: Replicado não-tratado que contém todos os componentes do sistema de ensaio. Esta amostra é ensaiada juntamente com as amostras tratadas com o produto químico em estudo e as outras amostras de controlo, para determinar se o solvente interage com o sistema de ensaio.

▼M7

Não-classificado: Produtos químicos não classificados nas categorias 1, 2A ou 2B do sistema GHS da ONU, não classificados nas categorias 1 ou 2 do Regulamento CRE da UE ou não classificados nas categorias I, II ou III de irritantes oculares da Agência de Proteção do Ambiente dos E.U.A.

Corrosivo ocular: a) Produto químico que provoca lesões irreversíveis dos tecidos do olho; b) Produto químico classificado na categoria 1 do sistema GHS da ONU, na categoria 1 do Regulamento CRE da UE ou na categoria I de irritantes oculares da Agência de Proteção do Ambiente dos E.U.A.

Irritante ocular: a) Produto químico que, aplicado na superfície anterior do olho, provoca alterações reversíveis no olho; b) Produto químico classificado nas categorias 2A ou 2B do sistema GHS da ONU, na categoria 2 do Regulamento CRE da UE ou nas categorias II ou III de irritantes oculares da Agência de Proteção do Ambiente dos E.U.A.

Irritante ocular severo: a) Produto químico que, aplicado na superfície anterior do olho, provoca lesões dos tecidos do olho não reversíveis nos 21 dias seguintes ou que provoca uma degradação grave da visão; b) Produto químico classificado na categoria 1 do sistema GHS da ONU, na categoria 1 do Regulamento CRE da UE ou na categoria I de irritantes oculares da Agência de Proteção do Ambiente dos E.U.A.

Amostra de controlo positiva: Replicado que contém todos os componentes do sistema de ensaio e foi tratado com um produto químico que comprovadamente induz reação positiva. Para que possa determinar-se a variabilidade, ao longo do tempo, da reação a esta amostra de controlo, a reação não deve ser extrema.

Produtos químicos recomendados para demonstração de competência técnica: Série de produtos químicos da lista de produtos químicos de referência que os laboratórios que iniciam a aplicação do método podem utilizar para comprovar a sua competência técnica na execução do método de ensaio de referência validado.

Adequação: Relação do ensaio com o efeito em causa; pertinência e utilidade do ensaio para o fim em vista. Traduz a medida em que o ensaio mede ou prevê corretamente o efeito biológico em causa. A adequação compreende a exatidão (concordância) do método de ensaio (8).

Fiabilidade: Medida em que, utilizando o mesmo protocolo, um método de ensaio pode ser continuadamente reproduzido no mesmo laboratório e em laboratórios diferentes. A fiabilidade é avaliada com base nos valores calculados das reprodutibilidades intralaboratorial e interlaboratorial, bem como da repetibilidade intralaboratorial.

Ensaio alternativo: Ensaio destinado a substituir um ensaio de rotina aceite para identificação de perigos e/ou avaliação de riscos, que se concluiu proporcionar proteção equivalente, ou melhorar a proteção, da saúde pública e animal ou do ambiente, consoante o caso, comparativamente ao ensaio de rotina aceite, no que respeita a todos os produtos químicos e situações de ensaio possíveis.

Sensibilidade: Proporção dos produtos químicos positivos/ativos que são corretamente classificados pelo ensaio. Constitui uma medida da exatidão de um método de ensaio cujos resultados sejam estabelecidos em função de categorias e é um aspeto importante a ter em conta na avaliação da adequação do método de ensaio (8).

Lesões oculares graves: Lesão do tecido ocular ou degradação grave da visão em consequência da aplicação do produto químico em estudo na superfície anterior do olho, não totalmente reversível nos 21 dias após a aplicação.

Amostra de controlo do solvente/excipiente: Amostra não-tratada que contém todos os componentes do sistema de ensaio, incluindo o solvente ou excipiente, e é ensaiada, juntamente com as amostras tratadas com o produto químico em estudo e as outras amostras de controlo, para estabelecer a linha de base de reação para as amostras tratadas com o produto químico em estudo, dissolvido

▼M7

no mesmo solvente ou excipiente. Quando ensaiada com uma amostra de controlo negativa correspondente, esta amostra também permite determinar se o solvente ou excipiente interage com o sistema de ensaio.

Especificidade: Proporção dos produtos químicos negativos/inativos que são corretamente classificados pelo ensaio. Constitui uma medida da exatidão de um método de ensaio cujos resultados sejam estabelecidos em função de categorias e é um aspeto importante a ter em conta na avaliação da adequação do método de ensaio.

Substância: Utiliza-se no contexto do sistema GHS da ONU para designar os elementos químicos e os compostos destes, no estado natural ou obtidos por qualquer processo de produção, incluindo qualquer aditivo necessário para preservar a estabilidade do produto e qualquer impureza derivada do processo utilizado, mas excluindo solventes que possam ser separados sem afetar a estabilidade da substância nem lhe modificar a composição.

Produto químico em estudo: Qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado este método de ensaio.

Estratégia de ensaio sequencial por etapas: Estratégia sequencial de ensaio em que, seguindo uma ordem estabelecida, se avalia toda a informação disponível sobre o produto químico em estudo, por um processo baseado na ponderação da suficiência da prova em cada etapa, com o objetivo de determinar se há informação suficiente para uma decisão de classificação de perigosidade antes de passar à etapa seguinte. Se a informação existente possibilitar a atribuição de um potencial de irritação ao produto químico em estudo, não serão necessários mais ensaios. Se a informação existente não possibilitar a atribuição de um potencial de irritação ao produto químico em estudo, procede-se a uma série de ensaios sequenciais em animais até ser possível atribuir uma classificação inequívoca.

Método de ensaio validado: Método de ensaio relativamente ao qual foram concluídos estudos de validação com vista a determinar a sua adequação (incluída a exatidão) e a sua fiabilidade para um determinado fim. Importa referir que um método de ensaio validado pode não ser suficientemente exato e fiável para se considerar aceitável para o fim pretendido (8).

Ponderação da suficiência da prova: Processo que consiste em ponderar os pontos fortes e os pontos fracos dos vários elementos de informação para tirar conclusões fundamentadas sobre o potencial de perigosidade do produto químico.

▼M7

Apêndice 3

PRODUTOS QUÍMICOS RECOMENDADOS PARA DEMONSTRAÇÃO DE COMPETÊNCIA TÉCNICA NO MÉTODO DE ENSAIO DE DIFUSÃO DE FLUORESCEÍNA

Antes de este método de ensaio passar a ser utilizado por rotina, os laboratórios devem comprovar a sua competência técnica identificando corretamente a classificação de corrosividade ocular dos oito produtos químicos recomendados no quadro 1. Estes produtos químicos foram selecionados de modo a representarem a gama de reações de corrosão ou de irritação ocular local baseada nos resultados do ensaio ocular *in vivo* no coelho (TG 405, método de ensaio B.5 (5)) — ou seja, as categorias 1, 2A, 2B ou nenhuma classificação segundo o sistema GHS da ONU. Porém, atendendo à utilização do ensaio de difusão de fluoresceína que se encontra validada (unicamente a identificação de corrosivos oculares e de irritantes oculares severos), apenas há que demonstrar competência em relação a dois resultados classificativos obtidos no ensaio (corrosivo/irritante severo e não-corrosivo/não-irritante severo). Outros critérios de seleção foram a disponibilidade do produto químico no comércio, a existência de dados de referência *in vivo* de alta qualidade e a existência de dados de alta qualidade pelo método de difusão de fluoresceína. Foi nesta base que se selecionaram os produtos químicos a recomendar para a demonstração de competência técnica do *Fluorescein Leakage Assay Background Review Document as an Alternative Method for Eye Irritation Testing* (8), documento utilizado na validação retrospetiva do método de ensaio de difusão de fluoresceína.

Quadro 1

Produtos químicos recomendados para demonstração de competência técnica no método de ensaio de difusão de fluoresceína.

Produto químico	N.º de registo CAS	Classe química (1)	Fase	Classificação *in vivo* (2)	Classificação *in vitro* (3)
Cloreto de benzalcónio (5 %)	8001-54-5	Sal de amónio quaternário	Líquida	Categoria 1	Corrosivo/irritante severo
Cloridrato de prometazina	58-33-3	Amina/amidina, composto heterocíclico, composto organossulfurado	Sólida	Categoria 1	Corrosivo/irritante severo
Hidróxido de sódio (10 %)	1310-73-2	Composto alcalino	Líquida	Categoria 1	Corrosivo/irritante severo
Laurilsulfato de sódio (15 %)	151-21-3	Ácido carboxílico (sal)	Líquida	Categoria 1	Corrosivo/irritante severo
4-Carboxibenzaldeído	619-66-9	Ácido carboxílico, aldeído	Sólida	Categoria 2(A)	Não-corrosivo/não-irritante severo
Nitrato de amónio	6484-52-2	Sal inorgânico	Sólida	Categoria 2(A)	Não-corrosivo/não-irritante severo
2-Metilacetoacetato de etilo	609-14-3	Cetona, éster	Líquida	Categoria 2(B)	Não-corrosivo/não-irritante severo
Glicerol	56-81-5	Álcool	Líquida	Nenhuma categoria	Não-corrosivo/não-irritante severo

Abreviaturas: N.º de registo CAS = Número de registo do *Chemical Abstracts Service*.

(1) Os produtos químicos foram classificados em classes químicas segundo um sistema normalizado, com base nos Medical Subject Headings («classificadores de temas médicos», MeSH) da Biblioteca Nacional de Medicina dos Estados Unidos da América (http//www.nlm.nih.gov/mesh).

(2) Com base nos resultados do ensaio ocular *in vivo* no coelho (TG 405 da OCDE, método de ensaio B.5) e nos sistemas GHS da ONU e do Regulamento CRE da UE.

(3) Com base nos resultados *obtidos* no método de difusão de fluoresceína (protocolo INVITTOX n.º 71 (6)).

▼M7

B.62. ENSAIO DOS COMETAS *IN VIVO* COM CÉLULAS DE MAMÍFEROS EM MEIO ALCALINO

INTRODUÇÃO

O presente método de ensaio é equivalente ao *Test Guideline* 489 (2016) da OCDE. O ensaio dos cometas *in vivo* com células de mamíferos em meio alcalino, por eletroforese em gel de células isoladas (a seguir designado simplesmente por «ensaio dos cometas») serve para a deteção de quebras em cadeias do ADN de células ou núcleos isolados de vários tecidos de animais, geralmente roedores, que tenham sido expostos a matérias potencialmente genotóxicas. O ensaio dos cometas foi revisto e diversos grupos de peritos publicaram recomendações — (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10). O presente método faz parte de uma série de métodos de ensaio sobre toxicologia genética. Está disponível um documento da OCDE que fornece informações sucintas sobre ensaios de toxicologia genética e resume as alterações recentemente efetuadas às orientações da OCDE nesse domínio (11).

O objetivo do ensaio dos cometas é identificar produtos químicos que provoquem danos no ADN. Em condições alcalinas (pH > 13), o ensaio dos cometas permite detetar quebras simples ou duplas, resultantes, por exemplo, de interações diretas com o ADN, de sítios lábeis em meio alcalino ou em consequência de quebras transientes de cadeias de ADN resultantes da reparação de excisões. Estas quebras de cadeia podem ser reparadas de forma a não produzirem efeitos persistentes, podem ser fatais para a célula ou podem ser fixadas numa mutação de que resulte uma alteração viável permanente. Podem também conduzir a lesões cromossómicas associadas a muitas doenças humanas, nomeadamente o cancro.

No período 2006-2012, realizou-se um ensaio de validação formal do ensaio dos cometas *in vivo* com roedores, coordenado pelo centro japonês para a validação de métodos alternativos (JaCVAM), em cooperação com o CEVMA (Centro Europeu de Validação de Métodos Alternativos), o ICCVAM (*Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*) e o NICEATM (*Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods*) (12). Este método de ensaio abrange a utilização recomendada e as limitações do ensaio dos cometas e assenta no protocolo final (12) utilizado no estudo de validação, bem como em outros dados relevantes, publicados ou não (neste último caso, propriedade de laboratórios).

Os termos-chave são definidos no apêndice 1. De notar que podem ser utilizadas no ensaio muitas plataformas diferentes (lâminas de microscópio, gotas de gel, placas de 96 poços, etc.). Por motivos de conveniência, utiliza-se o termo «lâmina» em todo o documento, embora abranja todas as outras plataformas.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES

O ensaio dos cometas é um método de determinação de quebras da cadeia do ADN em células eucariotas. As células/núcleos isolados, incorporados em agarose, numa lâmina, são lisados com detergente e uma elevada concentração de sal. Esta etapa de lise digere as membranas das células e dos núcleos e permite a libertação de fragmentos de hélices de ADN geralmente chamados nucleoides e fragmentos de ADN. A eletroforese a pH elevado produz estruturas semelhantes a cometas que, por recurso a corantes fluorescentes adequados, podem ser observados por microscopia de fluorescência; Os fragmentos de ADN deslocam-se da «cabeça» para a «cauda» em função das suas dimensões. A intensidade da cauda do cometa em relação à intensidade total (cabeça e cauda) reflete a proporção da rutura do ADN (13) (14) (15).

O ensaio dos cometas *in vivo* em meio alcalino é especialmente importante para avaliar a genotoxicidade, na medida em que as respostas dependem da absorção, da distribuição, do metabolismo e da excreção *in vivo*, bem como dos processos de reparação do ADN. Estes podem variar, consoante as espécies, em função dos tecidos e dos tipos de lesões do ADN.

▼M7

De forma a atender aos requisitos de bem-estar animal, nomeadamente a redução do recurso a animais de acordo com a regra dos três R (em inglês *Replacement, Reduction, Refinement* — substituição, redução, refinamento), o ensaio pode ser combinado com outros estudos toxicológicos, como estudos de toxicidade de dose repetida (10) (16) (17), podendo também o parâmetro ser combinado com outros parâmetros de genotoxicidade, como o ensaio *in vivo* de micronúcleos em células de mamíferos (18) (19) (20). Na maioria dos casos, o ensaio dos cometas utiliza roedores, embora tenha já sido aplicado a outras espécies de mamíferos e não-mamíferos. A utilização de espécies diferentes dos roedores deve ser justificada científica e eticamente, caso a caso, recomendando-se vivamente que o ensaio dos cometas seja efetuado com essas espécies apenas no contexto de outro estudo de toxicidade, e não de forma autónoma.

A seleção da via de exposição e dos tecidos a estudar deve basear-se em todos os dados disponíveis sobre os produtos químicos em estudo, como a via prevista de exposição humana, o metabolismo e a distribuição, o potencial de efeitos no local de contacto, os alertas estruturais, outros dados de toxicidade ou de genotoxicidade e o objetivo do estudo. Assim, se pertinente, o potencial genotóxico dos produtos químicos em estudo pode ser determinado nos tecidos que são alvo dos efeitos cancerígenos e/ou de outros efeitos tóxicos. O ensaio é também considerado útil para a investigação suplementar da genotoxicidade detetada por um sistema *in vitro*. É conveniente efetuar um ensaio dos cometas *in vivo* num tecido de interesse nos casos em que se possa razoavelmente esperar que esse tecido sofrerá uma exposição adequada.

O ensaio foi objeto de uma validação mais extensiva com tecidos somáticos de ratos machos em estudos de colaboração, nomeadamente os promovidos pelo JACVAM (12) e por Rothfuss *et al*., 2010 (10). O estudo de validação internacional do JACVAM utilizou tecidos do fígado e do estômago. A utilização do fígado deveu-se a este ser o órgão mais ativo no metabolismo dos produtos químicos e também, frequentemente, um órgão-alvo de carcinogenicidade. Quanto ao estômago, é geralmente primeiro ponto de contacto dos produtos químicos após exposição oral, embora outras áreas do trato gastrointestinal, como o duodeno e o jejuno, devam também ser consideradas tecidos de contacto, eventualmente mais relevantes para os seres humanos do que o estômago glandular dos roedores. Deve ter-se o cuidado de assegurar que os tecidos em causa não são expostos a concentrações excessivas do produto químico em estudo (21). Em princípio, a técnica é aplicável a todos os tecidos dos quais se possam obter suspensões analisáveis de células/núcleos isolados. Dados de propriedade industrial de vários laboratórios demonstram a sua aplicação com êxito a uma grande diversidade de tecidos, existindo muitas publicações que demonstram a aplicabilidade da técnica a órgãos ou tecidos para além do fígado e do estômago, como, p. ex., o jejuno (22), os rins (23) (24), a pele (25) (26), a bexiga urinária (27) (28), os pulmões e as células de lavagem broncoalveolar (importante para estudos de inalação de produtos químicos) (29) (30); também se realizaram ensaios com vários órgãos (31) (32).

Embora possa haver interesse no estudo dos efeitos genotóxicos em células germinativas, deve notar-se que a norma de ensaio dos cometas em meio alcalino descrita no presente método de ensaio não se considera adequada para determinar quebras da cadeia do ADN de células germinativas maduras. Dado que uma análise da bibliografia sobre a utilização do ensaio dos cometas para avaliar a genotoxicidade em células germinativas (33) revelou níveis de fundo elevados e variáveis de danos no ADN, considera-se necessário efetuar alterações ao protocolo, além de estudos de normalização e validação mais aprofundados, para que o método de ensaio dos cometas possa abranger células germinativas maduras (por exemplo, espermatozoides). Acresce que o regime de exposição recomendado, que o presente método de ensaio descreve, não é ideal, sendo necessárias exposições e tempos de amostragem mais longos para uma análise significativa das quebras de cadeias de ADN em espermatozoides maduros. A bibliografia (34) (35) descreve efeitos genotóxicos determinados pelo ensaio dos cometas em células testiculares, em diferentes fases da diferenciação. De notar, contudo, que as gónadas contêm uma mistura de células somáticas e germinativas. Por isso, a obtenção de resultados positivos na generalidade dos tecidos provenientes das gónadas (testículos) não reflete necessariamente a ocorrência de danos nas células germinativas; indica, porém, que o(s) produto(s) químico(s) em estudo(s) e/ou os seus metabolitos atingiram esses tecidos.

▼M7

As condições experimentais-padrão do ensaio dos cometas não permitem detetar de forma fiável a ocorrência de ligações cruzadas. Em determinadas condições experimentais modificadas, é possível detetar ligações cruzadas ADN-ADN e ADN-proteína, bem como outras alterações, como bases oxidadas (23) (36) (37) (38) (39). São, contudo, necessários trabalhos complementares para caracterizar de forma adequada as modificações necessárias ao protocolo. Assim, a deteção de agentes de reticulação não constitui o objetivo principal do ensaio descrito. O ensaio não é adequado, mesmo com alterações, para detetar aneugénios.

No estado atual dos conhecimentos, o ensaio dos cometas *in vivo* apresenta várias limitações adicionais (ver apêndice 3). Prevê-se que o método de ensaio seja revisto no futuro e, se necessário, adaptado em função da experiência adquirida.

Antes da aplicação do método de ensaio a uma mistura para obter dados com fins regulamentares, importa ponderar se — e, em caso afirmativo, por que motivo — o método pode proporcionar resultados adequados para o efeito. Tais considerações são dispensáveis se houver um requisito regulamentar para o ensaio da mistura.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

Os animais são expostos ao produto químico em estudo por uma via apropriada. Nos pontos 36-40 faz-se uma descrição pormenorizada do doseamento e da recolha de amostras. No(s) tempo(s) de amostragem selecionado(s), dissecam-se os tecidos de interesse e preparam-se as suspensões de células/núcleos (se se considerar útil, pode efetuar-se perfusão *in situ*, p. ex., do fígado), que se integram em ágar macio, de forma a imobilizá-las nas lâminas. As células ou os núcleos são tratados com tampão de lise, para remover a membrana celular e/ou nuclear, e expostos a um álcali forte (p. ex., a pH $\geq$ 13), para permitir o desenrolamento e a libertação de lacetes e fragmentos de ADN. O ADN nuclear presente no ágar é então sujeito a eletroforese. As moléculas de ADN normais não fragmentadas permanecem na posição em que o ADN nuclear foi colocado no ágar, enquanto os fragmentos e lacetes de ADN libertados migram para o ânodo. Após a eletroforese, o ADN é visualizado por recurso a um corante de fluorescência adequado. As preparações são analisadas por recurso a um microscópio e a sistemas de análise de imagens automáticos ou semiautomáticos. A quantidade de ADN que migrou durante a eletroforese e a distância de migração refletem a quantidade e a dimensão dos fragmentos de ADN. O ensaio dos cometas permite avaliar vários parâmetros. Recomenda-se utilizar a quantidade de ADN presente na «cauda» (percentagem de ADN de «cauda» ou intensidade percentual da «cauda») para avaliar os danos sofridos pelo ADN (12) (40) (41) (42). Após a análise de um número suficiente de núcleos, os dados são analisados por métodos adequados, para estabelecer os resultados do ensaio.

De notar que se investigou a alteração de diversos aspetos da metodologia, nomeadamente a preparação das amostras, as condições de eletroforese, os parâmetros da análise visual (p. ex., intensidade da mancha e da iluminação do microscópio, utilização de filtros no microscópio e de uma câmara dinâmica) e as condições ambientais (p. ex., a iluminação de fundo), podendo essa alteração afetar a migração do ADN (43) (44) (45) (46).

VERIFICAÇÃO DA PROFICIÊNCIA DO LABORATÓRIO

Cada laboratório deve estabelecer a sua competência experimental no ensaio dos cometas, demonstrando a sua capacidade para obter suspensões de núcleos ou de células isoladas com qualidade suficiente, em relação a cada tecido-alvo de cada espécie utilizada. A qualidade das preparações será avaliada, em primeiro lugar, pela percentagem de ADN de «cauda» no caso dos animais expostos ao veículo incluídos numa gama baixa de reprodutibilidade. Os dados disponíveis indicam que a percentagem média de ADN de «cauda» do grupo (com base na média das medianas — ver ponto 57 para mais pormenores), no caso do fígado de ratazana, não deve, de preferência, exceder 6 %, nível coerente com os valores constantes do ensaio de validação JaCVAM (12) e de outros dados publicados e dados de propriedade industrial. Não há, de momento, dados suficientes para elaborar

▼M7

recomendações sobre gamas melhores ou aceitáveis para outros tecidos — o que não impede a utilização de outros tecidos, se tal se justificar. O relatório do ensaio deve incluir uma análise adequada do desempenho do ensaio dos cometas nesses tecidos relativamente às descrições da bibliografia já publicada ou a dados de propriedade industrial. Em primeiro lugar, é conveniente obter uma gama baixa de percentagem de ADN de «cauda» nos controlos para detetar um efeito positivo. Em segundo lugar, cada laboratório deve ser capaz de reproduzir as respostas esperadas para os mutagénios e pro-mutagénios diretos com diferentes modos de ação, como sugerido no quadro 1 (ponto 29).

Se pertinente, as substâncias positivas podem ser selecionadas, por exemplo, com base no ensaio de validação JaCVAM (12) ou em outros dados publicados (ver ponto 9), de forma devidamente justificada, demonstrando a ocorrência de respostas inequivocamente positivas nos tecidos de interesse. Deve também demonstrar-se a capacidade para detetar efeitos fracos de mutagénios conhecidos, como EMS em doses baixas: por exemplo, estabelecendo relações dose-resposta com números e espaçamentos adequados para as doses. Os esforços devem começar por se concentrar no estabelecimento da competência em relação aos tecidos mais comummente utilizados, como o fígado de roedores, para os quais é possível efetuar comparações com os dados existentes e os resultados previstos (12). É possível recolher, em simultâneo, dados respeitantes a outros tecidos, como o estômago, o duodeno, o jejuno, o sangue, etc. O laboratório tem de demonstrar proficiência em relação a cada tecido de cada espécie que tencione estudar, bem como a possibilidade de obter, nesse tecido, uma resposta positiva aceitável a um agente mutagénico conhecido (por exemplo, EMS).

Devem recolher-se dados para o veículo e o controlo negativo, por forma a demonstrar a reprodutibilidade dos dados respeitantes às respostas negativas e a garantir que os aspetos técnicos do ensaio foram objeto de um controlo adequado ou sugerir a necessidade de restabelecer gamas históricas para os controlos (ver ponto 22).

De notar que, embora na autópsia se possam colher vários tecidos para processamento por análise pelo método dos cometas, o laboratório deve ser competente na colheita de vários tecidos de um só animal, garantindo assim que não é negligenciada nenhuma eventual lesão do ADN e que a análise não é posta em causa. O período decorrido entre a eutanásia e a remoção dos tecidos para processamento pode ser crítico (ver ponto 44).

O bem-estar dos animais deve ser tido em conta no presente ensaio de competência, pelo que o mesmo pode recorrer a tecidos animais utilizados em outros ensaios para a aquisição de competências nos seus diversos aspetos. Além disso, pode não ser necessário um estudo completo durante as fases de estabelecimento de um novo método de ensaio em laboratório, o que permitirá utilizar um menor número de animais ou de concentrações de ensaio para estabelecer as competências necessárias.

Dados históricos de controlo

No decurso das investigações de competência, o laboratório deve construir uma base de dados históricos com vista a estabelecer gamas e distribuições de controlos positivos e negativos para tecidos e espécies relevantes. A bibliografia (47) contém recomendações sobre o modo de obter e utilizar os dados históricos (critérios de inclusão e exclusão de dados em séries históricas e critérios de aceitação para um determinado ensaio). Diferentes tecidos e espécies, bem como diferentes veículos e vias de administração, podem originar diferentes valores percentuais de ADN de «cauda» nos controlos negativos. Importa, pois, estabelecer gamas de controlo negativo para cada tecido e cada espécie. Os laboratórios devem utilizar métodos de controlo de qualidade, como gráficos de controlo (p. ex., gráficos C ou gráficos de barras (48)), para identificar a

▼M7

variabilidade dos seus dados e demonstrar que, no laboratório em causa, a metodologia está sob controlo A seleção das substâncias de controlo positivo adequadas, das gamas de doses e das condições experimentais (p. ex., condições de eletroforese) pode também ter de ser otimizada para a deteção de efeitos fracos (ver ponto 17).

Quaisquer alterações do protocolo experimental devem ser ponderadas em função da sua coerência com as bases de dados históricos de controlo do laboratório. As incoerências de monta devem conduzir à constituição de uma nova base de dados históricos de controlo.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Preparações

Escolha da espécie animal

Utilizam-se normalmente estirpes laboratoriais comuns de roedores adultos, jovens e saudáveis, com 6-10 semanas de idade no início do ensaio, embora sejam aceitáveis animais ligeiramente mais velhos. A escolha das espécies de roedores deve ter por base: i) espécies utilizadas em outros estudos de toxicidade (possibilidade de estabelecer uma correlação entre os dados e de realizar estudos integrados); ii) espécies que desenvolveram tumores num estudo de carcinogenicidade, quando se investiga o mecanismo da carcinogénese; ou iii) espécies com o metabolismo mais próximo do humano, se conhecido. No presente ensaio, utilizam-se normalmente ratos. No entanto, podem utilizar-se outras espécies, caso tal se justifique dos pontos de vista científico e ético.

Condições de alojamento e de alimentação dos animais

No caso dos roedores, a temperatura ideal do biotério experimental é de 22 °C (± 3 °C). A humidade relativa ideal é de 50-60 %, com um mínimo de 30 % e um máximo de 70 %, exceto durante a lavagem do biotério. A iluminação deve ser artificial, com uma sequência de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão. Na alimentação, podem utilizar-se dietas convencionais de laboratório e deve ser fornecida água de beber sem restrições. Se o produto químico em estudo for administrado pela alimentação, a escolha da dieta poderá ser condicionada pela necessidade de assegurar a dosagem adequada. Os roedores devem ser mantidos em pequenos grupos (em geral, não mais do que cinco) do mesmo sexo, se não for previsível um comportamento agressivo. Os animais só podem ser alojados individualmente se tal se justificar do ponto de vista científico. Devem utilizar-se, sempre que possível, pavimentos sólidos, dado que os pavimentos reticulados podem causar ferimentos graves (49). Deve proporcionar-se um enriquecimento ambiental adequado.

Preparação dos animais

Distribuem-se aleatoriamente os animais pelos grupos de controlo e pelos grupos de exposição. Os animais são identificados de forma inequívoca e aclimatados às condições de laboratório durante pelo menos cinco dias antes de se iniciar o ensaio. Deve utilizar-se o método menos invasivo que permita identificar os animais de forma inequívoca. Os meios adequados incluem a colocação de anilhas, marcações ou *microchips* e a identificação biométrica. Os entalhes de orelhas e a amputação de falanges não se justificam cientificamente nestes ensaios. As gaiolas devem ser dispostas de forma a minimizar possíveis efeitos derivados do seu posicionamento. No início do estudo, a diferença de peso entre os animais deve ser mínima, não devendo exceder ± 20 % do peso médio de cada sexo.

Preparação das doses

Os produtos químicos em estudo no estado sólido devem ser dissolvidos ou suspensos em veículos adequados ou misturados na dieta ou na água potável, antes da dosagem dos animais. Os produtos químicos em estudo no estado líquido podem ser adicionados diretamente aos sistemas em estudo e/ou diluídos, antes da dosagem. Para exposições por inalação, os produtos químicos em estudo podem ser administrados sob a forma de gás, vapor ou aerossol sólido/líquido, dependendo das respetivas propriedades físico-químicas (50) (51).

▼M7

Devem utilizar-se preparações frescas do produto químico em estudo, a menos que os dados de estabilidade demonstrem que o mesmo pode ser armazenado e determinem as condições de armazenagem adequadas.

Condições de ensaio

Veículo

O veículo não deve produzir efeitos tóxicos nas doses utilizadas nem reagir com os produtos químicos em estudo. Caso se utilizem veículos cujas propriedades não se encontrem totalmente elucidadas, devem fornecer-se dados que justifiquem a sua compatibilidade em relação aos animais de ensaio, à via de administração e ao parâmetro pretendido. Sempre que possível, recomenda-se a utilização de um solvente/veículo aquoso. De referir que alguns veículos (em especial os veículos viscosos) podem provocar reação inflamatória e aumentar os níveis de base de quebras de cadeias de ADN no ponto de contacto, nomeadamente em caso de administrações múltiplas.

Grupos de controlo

Amostras de controlo positivas

Nesta fase, cada ensaio deve, normalmente, ser efetuado com um grupo constituído por, no mínimo, 3 animais analisáveis de um sexo ou (se se utilizarem ambos os sexos) de cada sexo (ver ponto 32), expostos a uma substância de controlo positivo. No futuro, poderá ser possível demonstrar competência adequada para reduzir a necessidade de controlos positivos. Se se utilizarem tempos de amostragem múltiplos (p. ex., com um único protocolo de administração), apenas é necessário incluir os controlos positivos num dos tempos de amostragem, devendo, porém, assegurar-se uma conceção equilibrada (ver ponto 48). Não é necessário administrar substâncias de controlo positivo em paralelo pela mesma via que o produto químico em estudo, embora seja importante utilizar essa via na determinação de efeitos nos tecidos de contacto. Deve comprovar-se que as substâncias de controlo positivo induzem quebras de cadeias de ADN em todos os tecidos de interesse para a substância química em estudo, sendo o EMS suscetível de ser o controlo positivo escolhido, dado produzir quebras de cadeias de ADN em todos os tecidos já estudados. As doses das substâncias de controlo positivo devem ser escolhidas de modo a produzir efeitos moderados para a avaliação crítica do desempenho e da sensibilidade do ensaio, podendo basear-se em curvas dose-resposta estabelecidas pelo laboratório durante a demonstração de competência. A percentagem de ADN de «cauda» registada nos animais do controlo positivo realizado em paralelo deve ser coerente com a gama laboratorial pré-estabelecida para cada tecido e cada tempo de amostragem, no respeitante a essa espécie (ver ponto 16). O quadro 1 inclui exemplos de substâncias de controlo positivo e de alguns dos respetivos tecidos-alvo em roedores. Podem utilizar-se substâncias que não constem do quadro 1, caso tal se justifique cientificamente.

Quadro 1

Exemplos de substâncias de controlo positivo e de alguns dos respetivos tecidos-alvo

Substâncias e n.º CAS RN
Metanossulfonato de etilo (CAS RN 62-50-0), para todos os tecidos
Etilnitrosureia (CAS RN 759-73-9), para o fígado e o estômago, o duodeno ou o jejuno
Metanossulfonato de metilo (CAS RN 66-27-3), para o fígado, o estômago, o duodeno ou o jejuno, os pulmões e as células de lavagem broncoalveolar, os rins, a bexiga, os testículos, o pulmão e a medula/o sangue
N-Metil-*N*′-nitro-*N*-nitrosoguanidina (CAS RN: 70-25-7) para o estômago, o duodeno ou o jejuno
1,2-Dimetil-hidrazina.2HCl (CAS RN 306-37-6), para o fígado e o intestino
N-metil-*N*-nitrosoureia (CAS RN 684-93-5), para o sangue, a medula óssea, o fígado, os rins, o estômago, o jejuno e o cérebro.

▼M7

Controlos negativos

Em cada ensaio, para cada tempo de amostragem e tecido, deve utilizar-se um grupo de animais de controlo negativo, tratados apenas com veículo e, em todos os outros aspetos, tratados do mesmo modo que os grupos de exposição. A percentagem de ADN de «cauda» registada nos animais do controlo negativo deve situar-se na gama laboratorial de base pré-estabelecida para cada tecido e cada tempo de amostragem, no respeitante a essa espécie (ver ponto 16). Na ausência de dados de controlo históricos ou publicados que demonstrem que o veículo escolhido, o número de administrações ou a via de administração não induzem nenhum efeito prejudicial ou genotóxico, devem realizar-se, antes do ensaio completo, estudos preliminares com vista a estabelecer a aceitabilidade do controlo do veículo.

PROCEDIMENTO DE ENSAIO

Número e sexo dos animais

Embora, no respeitante ao ensaio dos cometas, haja poucos dados sobre animais do sexo feminino que permitam a comparação entre os sexos, em geral, outras respostas de genotoxicidade *in vivo* são semelhantes entre machos e fêmeas, pelo que os estudos podem ser realizados, na sua maioria, com ambos os sexos. Dados reveladores de diferenças significativas entre machos e fêmeas (p. ex., diferenças de toxicidade sistémica, de metabolismo, de biodisponibilidade, etc., designadamente em estudos exploratórios de gamas de dosagem) aconselham a utilização de ambos os sexos. Neste caso, poderá ser adequado um estudo com ambos os sexos: p. ex., no contexto de um estudo de toxicidade de dose repetida. Pode justificar-se o recurso ao modelo fatorial, caso se utilizem animais de ambos os sexos. O apêndice 2 apresenta pormenores sobre a análise dos dados por recurso a este modelo.

A dimensão dos grupos no início do estudo, bem como durante o estabelecimento da competência, deve permitir dispor de um mínimo de 5 animais analisáveis do mesmo sexo por grupo ou, se forem utilizados ambos os sexos, de um mínimo de 5 animais analisáveis de cada sexo por grupo (menos no grupo de controlo positivo em paralelo — ver ponto 29). Nos casos em que a exposição humana aos produtos químicos possa ser específica para cada sexo, como acontece com alguns produtos farmacêuticos, o ensaio deve ser executado com animais do sexo em causa. A título de orientação, o número máximo de animais necessário num estudo realizado de acordo com os parâmetros estabelecidos no ponto 33, com três grupos de dosagem e, em paralelo, um grupo de controlo negativo e um grupo de controlo positivo (cada um deles constituído por cinco animais do mesmo sexo), será normalmente de 25 a 35.

PROGRAMAÇÃO DO ENSAIO

Os animais devem ser diariamente expostos ao produto químico em estudo, por um período de 2 ou mais dias (duas ou mais exposições com intervalos aproximados de 24 horas), devendo a primeira amostra ser colhida 2 a 6 h (ou a T_{max}) após a última exposição (12). São aceitáveis amostras colhidas na sequência de regimes de administração prolongada (p. ex., dose diária durante 28 dias). Foi demonstrada a possibilidade de combinar com êxito o ensaio dos cometas com o ensaio dos micronúcleos de eritrócitos (10) (19). No entanto, deve conferir-se especial atenção à logística envolvida na amostragem de tecidos para análise pelo método dos cometas, bem como aos requisitos de amostragem de tecidos para outros tipos de avaliações toxicológicas. A colheita 24 horas após a administração da última dose, que é característica de um estudo de toxicidade geral, não é adequada na maioria dos casos (ver ponto 40 no respeitante ao tempo de amostragem). Deve justificar-se o recurso a outros calendários de tratamento e

▼M7

amostragem (ver apêndice 3). Poderia, por exemplo, efetuar-se uma exposição única com amostragem múltipla; contudo, os estudos com uma única administração recorrem a mais animais, devido à necessidade de utilizar tempos de amostragem múltiplos, embora, por vezes, possam ser preferíveis, nomeadamente se o produto químico em estudo produzir toxicidade excessiva na sequência de administrações repetidas.

Independentemente da forma como for realizado, o ensaio é aceitável desde que o produto químico em estudo produza um resultado positivo ou, no caso de um ensaio negativo, que sejam apresentadas provas diretas ou indiretas de os tecidos-alvo terem sido expostos ou serem afetados pela toxicidade, ou ainda se a dose-limite for atingida (ver ponto 36).

Para facilitar a administração de grandes volumes, os produtos químicos em estudo também podem ser administrados sob a forma de dose dividida (ou seja, duas exposições no mesmo dia, separadas por não mais de 2 a 3 horas). Nestas condições, o tempo de amostragem deve ser programado em função da última administração (ver ponto 40).

Doses

Se, por não estarem disponíveis dados de outros estudos relevantes que possam servir de orientação na escolha das doses, for realizado previamente um estudo exploratório da gama de dosagens a administrar, este deve ter lugar no mesmo laboratório, utilizando a mesma espécie, a mesma estirpe, o mesmo sexo e o mesmo regime de exposição previstos para o estudo principal, de acordo com as abordagens correntemente utilizadas para a realização desses estudos. O estudo deve ter por objetivo identificar a dose máxima tolerável (DMT), definida como a dose que, durante o período de ensaio, produz efeitos ligeiramente tóxicos (por exemplo, sinais clínicos claros, como comportamentos ou reações anormais, uma ligeira redução do peso corporal ou citotoxicidade nos tecidos-alvo), mas não a morte ou sinais de dor, sofrimento ou stress que impliquem eutanásia. No caso da administração de produtos químicos em estudo não tóxicos por um período de 14 ou mais dias, a dose máxima (dose-limite) é de 1 000 mg/kg de peso corporal/ /dia. Se o período de administração for inferior a 14 dias, a dose máxima (dose- -limite) é de 2 000 mg/kg de peso corporal/dia. Estes limites podem variar para certos tipos de produtos químicos em estudo abrangidos por regulamentações específicas (p. ex., medicamentos para uso humano).

Os produtos químicos que exibam saturação das suas propriedades toxicocinéticas ou que induzam processos de desintoxicação passíveis de se traduzirem numa diminuição da exposição após administração prolongada podem constituir exceção aos critérios de fixação das doses, devendo ser avaliados caso a caso.

Tanto na versão aguda como na versão subaguda do ensaio dos cometas, além da dose máxima (MTD, dose máxima possível, exposição máxima ou dose-limite), deve selecionar-se, para cada tempo de amostragem, uma sequência decrescente de, pelo menos, duas doses adicionais, espaçadas de forma adequada (de preferência, separadas por um fator inferior a 10), a fim de demonstrar eventuais relações dose-efeito. Contudo, as doses utilizadas devem, de preferência, abarcar uma gama que vá da toxicidade máxima até uma toxicidade reduzida ou nula. Caso se observe toxicidade no tecido-alvo a todas as doses ensaiadas, recomenda-se a realização de um estudo complementar com doses não-tóxicas (ver pontos 54-55). Os estudos destinados a investigar de modo mais preciso a forma da curva dose-resposta podem exigir outras gamas de doses.

Administração das doses

Na conceção de um ensaio, deve ter-se em mente a via prevista de exposição humana. Por conseguinte, podem escolher-se, com justificação, vias de exposição como a alimentação, a água de beber, as vias subcutânea tópica, intravenosa e oral (por sonda gástrica), a inalação, a via intratraqueal ou os implantes. Em qualquer caso, a via escolhida deve garantir a exposição adequada do(s) tecido(s)-alvo. A injeção intraperitoneal não é, em geral, recomendada, uma vez que não se trata de uma via previsível de exposição humana, só devendo ser utilizada com justificação científica específica (p. ex., no caso de determinadas substâncias de controlo positivo, para fins de investigação, ou de alguns medicamentos administrados por via intraperitoneal). O volume máximo de líquido que pode

▼M7

ser administrado por gavagem ou injeção numa toma depende do tamanho do animal de ensaio, não devendo exceder 1 ml/100 g de peso corporal, com exceção das soluções aquosas, que podem utilizar-se na proporção de 2 ml/100 g de peso corporal. A utilização de volumes maiores (se permitida pela legislação no domínio do bem-estar dos animais) deve ser justificada. Sempre que possível, as diversas doses devem ser obtidas por ajustamento da concentração da formulação de dosagem, de modo a assegurar um volume constante em relação ao peso corporal em todas as dosagens.

Tempo de amostragem

O tempo de amostragem constitui uma variável crucial, uma vez que é determinado pelo período necessário para que os produtos químicos em estudo atinjam a concentração máxima no tecido-alvo e para que sejam induzidas quebras de cadeias de ADN, antes de essas quebras serem removidas ou reparadas ou provocarem a morte da célula. A persistência de algumas das lesões que levem à quebra de cadeias de ADN detetadas pelo ensaio dos cometas pode ser muito reduzida, pelo menos no que respeita a alguns produtos químicos sujeitos a ensaio *in vitro* (52) (53). Neste contexto, se se suspeitar da ocorrência de tais lesões do ADN, devem tomar-se medidas para atenuar as suas consequências, assegurando uma amostragem suficientemente precoce dos tecidos, se possível antes dos tempos por defeito abaixo indicados. A otimização do(s) tempo(s) de amostragem pode depender do produto químico ou de uma via específica, como a exposição rápida dos tecidos por administração intravenosa ou por inalação. Por conseguinte, sempre que possível, os tempos de amostragem devem ser determinados com base em dados cinéticos (p. ex., o instante — T_{max} — em que é atingido o pico de concentração — C_{max} — no plasma ou nos tecidos, ou o estado estacionário, em caso de várias administrações). Na ausência de dados cinéticos, um compromisso adequado para a medição da genotoxicidade consiste em colher a amostra 2 a 6 horas após a última exposição, no caso de duas ou mais exposições, ou 2 a 6 e 16 a 26 horas após uma única administração, tendo o cuidado de autopsiar todos os animais decorrido o mesmo tempo após a administração da última (ou única) dose. Podem também utilizar-se eventuais informações disponíveis sobre o surgimento de efeitos tóxicos em órgãos-alvo, para selecionar os tempos de amostragem adequados.

Exames

Os animais devem ser sujeitos a observações clínicas gerais pelo menos uma vez por dia, de preferência à(s) mesma(s) hora(s) todos os dias e tendo em conta o período de pico de efeitos antecipados após a administração da dose (54); os resultados dessas observações devem ser registados. Pelo menos duas vezes por dia, todos os animais devem ser observados para a deteção de sinais de morbilidade e mortalidade. Em estudos com duração mais longa, todos os animais devem ser pesados pelo menos uma vez por semana, bem como no final do período de ensaio. O consumo de alimentos deve ser medido em cada renovação dos mesmos e, pelo menos, uma vez por semana. Se o produto químico em estudo for administrado através da água de beber, o consumo desta deve ser medido em cada mudança de água e, pelo menos, uma vez por semana. Os animais que apresentem indicadores de toxicidade excessiva não letal devem ser eutanasiados antes do termo do período de ensaio; os dados que lhes dizem respeito não se utilizam, geralmente, na análise pelo método dos cometas.

Colheita de tecidos

Uma vez que é possível estudar a indução de quebra de cadeias de ADN («cometas») em praticamente qualquer tecido, o fundamento para a seleção do(s) tecido(s) a colher deve ser claramente definido e basear-se no motivo para a realização do estudo, bem como em quaisquer dados de absorção, distribuição, metabolismo, excreção, genotoxicidade, carcinogenicidade ou outros dados de toxicidade relativos aos produtos químicos em estudo. Nos fatores importantes a considerar devem incluir-se a via de administração [com base na(s) via(s) de exposição humana provável(is)], as previstas distribuição e absorção no tecido, o papel do metabolismo e o possível mecanismo de ação dos produtos químicos em estudo. O fígado tem sido o tecido mais frequentemente estudado e para o

▼M7

qual existem mais dados. Por conseguinte, na ausência de informações retrospetivas e sem a identificação de determinados tecidos específicos de interesse, justifica-se a colheita de amostras de fígado, dado constituir a localização principal do metabolismo xenobiótico e registar, com frequência, uma elevada exposição quer a substância(s)-mãe quer a metabolito(s). Em alguns casos, pode revelar-se mais curial a análise de um local de contacto direto (p. ex., no caso dos produtos químicos administrados por via oral, o estômago glandular, o duodeno ou o jejuno, ou, no caso dos produtos químicos administrados por inalação, os pulmões). Os tecidos adicionais ou alternativos devem ser selecionados com base nos motivos específicos que levam à realização do ensaio; a sua utilização pode ser útil em caso de análise de vários tecidos dos mesmos animais, desde que o laboratório tenha demonstrado aptidão com esses tecidos e competência na manipulação de vários tecidos múltiplos em simultâneo.

Preparação das amostras

Para os processos descritos nos pontos que se seguem (44-49), importa que todas as soluções ou suspensões estáveis sejam utilizadas dentro do seu prazo de validade, sem o que devem ser preparadas de novo. Nos pontos que se seguem, consideram-se também, como variáveis críticas, o tempo necessário para: i) eliminar cada tecido após a autópsia; ii) processar cada tecido para obter suspensões de células/núcleos; iii) processar a suspensão e preparar as lâminas (ver definições, apêndice 1); a duração aceitável dos períodos em causa para cada uma destas etapas deve ter sido determinada nas fases de estabelecimento do método e de demonstração de competência.

Os animais são eutanasiados no momento oportuno após a última exposição ao produto químico em estudo, respeitando a legislação em matéria de bem-estar dos animais e o princípio dos 3R. Os tecidos selecionados são removidos e dissecados, recolhendo-se uma porção para o ensaio dos cometas; simultaneamente, uma secção da mesma parte do tecido é cortada e colocada numa solução de formaldeído ou de um fixador adequado, para eventual exame histopatológico (ver ponto 55) por métodos normalizados (12). O tecido para o ensaio dos cometas é colocado num tampão de picagem, lavado suficientemente com o mesmo tampão a frio, para remover o sangue residual, e armazenado em tampão de picagem gelado até ao processamento. Pode também efetuar-se a perfusão *in situ*, p. ex., no caso do fígado ou dos rins.

Há um grande número de métodos publicados para o isolamento de células/núcleos. Estes métodos incluem a trituração de tecidos como o fígado ou o rim, a raspagem de superfícies de mucosas, no caso do trato gastrointestinal, a homogeneização e a digestão enzimática. O ensaio de validação JaCVAM estudou apenas células isoladas, pelo que, no respeitante ao estabelecimento do método e à possibilidade de remeter para os dados do ensaio JaCVAM para a demonstração de competência, são preferíveis as células isoladas. Verificou-se, contudo, que não há diferenças essenciais no resultado do ensaio quer se utilizem células isoladas ou núcleos isolados (8). Diversos métodos de isolamento de células ou núcleos (p. ex., homogeneização, trituração, digestão enzimática, filtração com crivo) fornecem resultados comparáveis (55). Por conseguinte, podem utilizar-se células isoladas ou núcleos isolados. Os laboratórios devem avaliar exaustivamente e validar métodos específicos dos tecidos para o isolamento de células/ /núcleos. Como referido no ponto 40, pode ser muito reduzida a persistência de algumas das lesões que levem à quebra de cadeias de ADN detetadas pelo ensaio dos cometas (52) (53). Assim, independentemente do método utilizado para preparar as suspensões de células ou núcleos, importa que os tecidos sejam processados o mais rapidamente possível depois de os animais serem eutanasiados e colocados em condições que dificultem a reparação de lesões (p. ex., mantendo o tecido a baixas temperaturas). As suspensões de células devem ser mantidas geladas até estarem prontas para utilização, de modo a proporcionar uma variação mínima interamostras e respostas de controlo positivas e negativas adequadas.

▼M7

PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS

As lâminas devem ser preparadas o mais rapidamente possível (idealmente no prazo de uma hora) após a preparação das células ou núcleos; a temperatura e o tempo decorrido entre a morte dos animais e a preparação das lâminas devem ser objeto de um controlo rigoroso e de validação em conformidade com as condições do laboratório. O volume da suspensão de células adicionado a agarose de baixo ponto de fusão (normalmente 0,5-1,0 %) na preparação das lâminas não deve reduzir a percentagem de agarose para menos de 0,45 %. A densidade celular ótima será determinada pelo sistema de análise das imagens utilizado para a contagem dos «cometas»

Lise

As condições de lise também são variáveis críticas e podem interferir com as quebras resultantes de determinados tipos específicos de modificações do ADN (certas alquilações e adições às bases). Recomenda-se, pois, que, para todas as lâminas de cada ensaio, se mantenham as condições de lise a níveis tão constantes quanto possível. Uma vez preparadas, as lâminas devem ser imersas numa solução de lise refrigerada durante, pelo menos, uma hora (ou de um dia para o outro) a cerca de 2-8 °C, com iluminação difusa (p. ex., luz amarela) ou ao abrigo da luz, de modo a evitar a exposição à luz branca, que pode conter componentes UV. Após este período de incubação, as lâminas são lavadas, para remover resíduos de detergentes e sais, antes da etapa de desenrolamento com álcali. Para tal, pode utilizar-se água purificada, tampão de neutralização ou tampão de fosfatos. Pode também utilizar-se tampão de eletroforese, o que permite manter a câmara de eletroforese em condições alcalinas.

Desenrolamento e eletroforese

As lâminas devem ser dispostas de forma aleatória na placa de uma unidade de eletroforese de imersão, com uma quantidade de solução suficiente para cobrir totalmente a superfície das lâminas (a profundidade desta cobertura deve ser constante nas várias séries experimentais). Com unidades de eletroforese de outro tipo (p. ex. com refrigeração ativa, circulação e tensão elevada), uma maior profundidade da solução de cobertura traduzir-se-á num aumento da intensidade da corrente, a tensão constante. Deve utilizar-se uma conceção equilibrada para colocar as lâminas na tina de eletroforese, com vista a atenuar os efeitos de eventuais tendências ou efeitos de borda no interior da tina; para minimizar a variabilidade entre lotes, ou seja, entre séries experimentais, deve utilizar-se o mesmo número de lâminas de cada animal no estudo e incluir-se amostras dos diversos grupos de doseamento e dos controlos (negativos e positivos). As lâminas devem ser mantidas durante, pelo menos, 20 minutos para o desenrolamento do ADN e, em seguida, submetidas a eletroforese em condições controladas que permitam maximizar a sensibilidade e a gama dinâmica do ensaio (isto é, conduzir a níveis percentuais aceitáveis de ADN de «cauda» nos controlos positivos e negativos, de forma a maximizar a sensibilidade). O nível de migração de ADN apresenta uma relação linear com a duração da eletroforese, bem como com o potencial (V/cm). Com base nos dados do ensaio JaCVAM, o valor deste último poderá ser de 0,7 V/cm durante, pelo menos, 20 minutos. A duração da eletroforese é considerada uma variável crítica, devendo a sua duração ser fixada, para otimizar a gama dinâmica. Os períodos de eletroforese mais longos (p. ex., 30 a 40 minutos, para maximizar a sensibilidade) produzem, em geral, respostas mais positivas com mutagénios conhecidos. No entanto, podem também conduzir a uma migração excessiva nas amostras de controlo. Em cada ensaio, a tensão deve ser mantida constante e a variabilidade dos outros parâmetros deve situar-se numa gama estreita e específica (p. ex., no ensaio JaCVAM, 0,7 V/cm produzem

▼M7

uma corrente inicial de 300 mA). A profundidade do tampão deve ser ajustada para se obterem as condições necessárias, a manter durante todo o ensaio. Deve registar-se a intensidade da corrente no início e no final da eletroforese. Importa, pois, determinar as condições ideais para cada tecido no contexto da primeira demonstração de competência no laboratório em causa. A temperatura da solução de eletroforese durante o desenrolamento e a eletroforese deve ser mantida a níveis baixos, geralmente da ordem de 2-10 °C (10). Deve registar-se a temperatura da solução de eletroforese no início do desenrolamento, no início da eletroforese e no final desta.

Após a conclusão da eletroforese, as lâminas devem ser imersas ou enxaguadas no tampão de neutralização durante, pelo menos, 5 minutos. Os géis podem ser coloridos e examinados a curto prazo (p. ex., 1-2 dias) ou desidratados para avaliação posterior (p. ex., 1-2 semanas após a coloração) (56). No entanto, as condições devem ser validadas durante a demonstração de competência, devendo os dados históricos ser obtidos e conservados separadamente para cada uma dessas condições. No último caso, as lâminas devem ser desidratadas por imersão em etanol absoluto durante, pelo menos, 5 minutos, secadas ao ar e, em seguida, armazenadas à temperatura ambiente ou num recipiente no frigorífico, até ao exame.

Métodos de medição

Os «cometas» devem ser avaliados quantitativamente por recurso a um sistema automático ou semiautomático de análise de imagens. As lâminas são coradas com um corante fluorescente adequado, como SYBR Gold, Green I, iodeto de propídio ou brometo de etídio, e observadas com uma ampliação adequada (p. ex., 200x) num microscópio equipado para epifluorescência e com detetores adequados, ou uma câmara digital (p. ex., CDD).

As células podem ser classificadas em três categorias — como descrito no atlas de imagens (57) — a saber: mensurável, não mensurável e «ouriço» (ver ponto 56 para mais pormenores). A fim de evitar perturbações, apenas as células mensuráveis (cabeça e cauda claramente definidas, sem qualquer interferência com as células vizinhas) devem ser analisadas para a determinação da percentagem de ADN de «cauda» Não é necessário referir a frequência de células não mensuráveis. Dada a ausência de uma «cabeça» bem definida significar que as células «ouriços» não são facilmente detetadas por análise das imagens, a frequência dessas células deve ser determinada com base no exame visual de, pelo menos, 150 células por amostra (ver ponto 56 para mais pormenores) e documentada separadamente.

Todas as lâminas para análise, incluindo as dos controlos positivos e negativos, devem ser codificadas independentemente e avaliadas de forma «cega» para que o operador não conheça o tipo de tratamento efetuado. Para cada amostra (por tecido e por animal), devem analisar-se, pelo menos, 150 células (excluindo os «ouriços» — ver ponto 56). O exame de 150 células por animal com, pelo menos, 5 animais por dose (exceto no controlo positivo em paralelo — ver ponto 29) proporciona uma representatividade estatística adequada, de acordo com a análise realizada por Smith *et al* em 2008 (5). Caso se recorra a lâminas, poderão examinar-se 2 ou 3 lâminas por amostra, se se utilizarem 5 animais por grupo. Devem examinar-se várias zonas da lâmina a uma densidade à qual não se registe sobreposição das caudas. Deve evitar-se examinar a borda das lâminas.

No ensaio dos cometas, as quebras de cadeias de ADN podem ser avaliadas com base em parâmetros independentes, como a percentagem de ADN de «cauda» o seu comprimento e o momento. Podem efetuar-se as três medições se se utilizar um *software* adequado de análise de imagens. Recomenda-se, contudo, utilizar a percentagem de ADN de «cauda» (também conhecida por percentagem de intensidade da «cauda») para a avaliação e a interpretação dos resultados (12) (40) (41) (42); essa percentagem é determinada pela intensidade de fragmentos de ADN na «cauda» expressa em percentagem da intensidade celular total (13).

▼M7

Lesão de tecidos e citotoxicidade

A obtenção de resultados positivos no ensaio dos cometas pode não se dever exclusivamente à genotoxicidade; a toxicidade no tecido-alvo poderá também resultar num aumento da migração do ADN (12) (41). Reciprocamente, uma citotoxicidade baixa ou moderada é muitas vezes associada a genotoxinas conhecidas (12), demonstrando a impossibilidade de distinguir entre a migração de ADN induzida pela genotoxicidade e a migração induzida pela citotoxicidade, no contexto exclusivo de um ensaio dos cometas. Todavia, se se observar um aumento da migração de ADN, recomenda-se o exame de um ou mais indicadores de citotoxicidade, que poderá contribuir para a interpretação dos resultados. O aumento da migração de ADN na presença de indícios evidentes de citotoxicidade deve ser interpretado com prudência.

Propuseram-se muitas medidas da citotoxicidade, entre as quais as alterações histopatológicas são consideradas uma medida relevante de toxicidade nos tecidos. Observações como a inflamação, a infiltração de células ou as alterações apoptóticas ou necróticas foram associadas a aumentos na migração do ADN; no entanto, o ensaio de validação JaCVAM demonstrou não existir nenhuma lista definitiva de alterações histopatológicas sistematicamente associável ao aumento da migração de ADN (12). As alterações de parâmetros do domínio da química clínica (p. ex., AST, ALT) podem também fornecer informações úteis sobre as lesões de tecidos; podem ainda ser tidos em conta outros indicadores, como a ativação da caspase, a coloração TUNEL, a coloração com Annexin V, etc. Há, porém, poucos dados publicados sobre a utilização destes últimos em estudos *in vivo*, alguns dos quais podem ser menos fiáveis do que outros.

Os «ouriços» (também chamados «nuvens» ou células-fantasma) são células cuja imagem ao microscópio é constituída por uma «cabeça» pequena ou inexistente e «caudas» grandes e difusas, sendo consideradas células muito danificadas, embora de etiologia incerta (ver apêndice 3). Devido à aparência destas células, as medições de percentagens de ADN de «cauda» por análise de imagens não são fiáveis, pelo que os «ouriços» devem ser avaliados separadamente. A ocorrência de «ouriços» deve ser registada e comunicada; deve investigar-se e interpretar-se com cuidado qualquer aumento apreciável dessa ocorrência que se possa atribuir ao produto químico em estudo. O conhecimento do modo de ação potencial dos produtos químicos em estudo pode ser útil neste contexto.

RESULTADOS E RELATÓRIO

Tratamento dos resultados

A unidade experimental é o animal, pelo que os dados respeitantes a cada um, juntamente com uma síntese dos resultados, devem ser apresentados sob a forma de um quadro. Devido à natureza hierárquica dos dados, recomenda-se a determinação da mediana da percentagem de ADN de «cauda» para cada lâmina e o cálculo da média dos valores das medianas para cada animal (12). Determina-se em seguida a média das médias respeitantes a cada animal, para se obter uma média de grupo. Todos estes valores devem ser incluídos no relatório. Podem utilizar-se abordagens alternativas (ver ponto 53) caso tal se justifique dos pontos de vista científico e estatístico. A análise estatística pode ser feita por recurso a várias abordagens (58) (59) (60) (61). Na seleção dos métodos estatísticos a utilizar, deve ponderar-se, em conformidade com as referências bibliográficas *supra*, a necessidade de transformação dos dados (p. ex., logarítmica ou por raiz quadrada) e/ou da adição de um pequeno número (p. ex., 0,001) a todos os valores — mesmo superiores a zero — para mitigar os efeitos dos valores celulares nulos. O apêndice 2 contém pormenores sobre a análise do tratamento/ /das interações entre os sexos quando se utilizam animais de ambos os sexos, bem como sobre a análise subsequente dos dados, quer se observem diferenças quer não. Devem também comunicar-se os resultados da toxicidade em animais e dos sinais clínicos.

Critérios de aceitabilidade

A aceitação do ensaio baseia-se nos seguintes critérios:

a. um controlo negativo realizado em paralelo é considerado aceitável para inclusão na base de dados históricos de controlo negativo do laboratório, nos termos descritos no ponto 16.

▼M7

b. as amostras de controlo positivo (ver ponto 29) devem induzir respostas compatíveis com as incluídas na base de dados históricos de controlo positivo e produzir um aumento estatisticamente significativo relativamente ao controlo negativo em paralelo.

c. analisaram-se números adequados de células e doses (pontos 52 e 36-38).

d. os critérios de seleção da dose mais elevada são coerentes com os descritos no ponto 36.

Avaliação e interpretação dos resultados

Caso se cumpram todos os critérios de aceitabilidade, o produto químico em estudo é considerado inequivocamente positivo se:

a. pelo menos uma das doses de ensaio apresentar um aumento estatisticamente significativo em relação ao controlo negativo,

b. o aumento, avaliado com base numa análise de tendências adequada, é dependente da dose,

c. há resultados fora da distribuição dos dados históricos do controlo negativo, para uma dada espécie, veículo, via, tecido ou número de administrações.

Se se preencherem todos estes critérios, o produto químico em estudo é considerado passível de induzir quebras de cadeias de ADN nos tecidos estudados no presente sistema de ensaio. Se só se cumprirem um ou dois destes critérios, ver ponto 62.

Caso se cumpram todos os critérios de aceitabilidade, o produto químico em estudo é considerado inequivocamente negativo se:

a. nenhuma das concentrações de ensaio apresentar um aumento estatisticamente significativo em relação ao controlo negativo,

b. não se observar nenhum aumento dependente da dose, numa avaliação feita com base numa análise de tendências adequada.

c. todos os resultados se situarem dentro da distribuição dos dados históricos do controlo negativo, para uma dada espécie, veículo, via, tecido ou número de administrações.

d. houver indícios comprovados, diretos ou indiretos, de os tecidos-alvo terem sido expostos ou serem afetados pela toxicidade.

O produto químico em estudo não é considerado passível de induzir quebras de cadeias de ADN nos tecidos estudados no presente sistema de ensaio.

Não há nenhuma exigência concreta para a verificação de uma resposta inequivocamente positiva ou negativa.

Se a resposta não for inequivocamente positiva nem negativa (isto é, se não se cumprirem todos os critérios enumerados nos pontos 59 ou 60), e para estabelecer a importância biológica de um resultado, os dados devem ser avaliados por peritos e/ou no âmbito de uma investigação complementar, caso tal se justifique do ponto de vista científico. Neste contexto, pode ser útil a contagem de células adicionais (se adequado) ou a realização de uma nova experiência, eventualmente com otimização das condições experimentais (p. ex., intervalo diferente entre as doses, outras vias de administração, outros tempos de amostragem ou outros tecidos).

Em certos casos, raros, mesmo após estudos complementares, os dados obtidos não permitirão concluir por um resultado positivo ou negativo, pelo que se considerará que o resultado é ambíguo.

▼M7

Para avaliar o significado biológico de um resultado positivo ou ambíguo, são necessárias informações sobre a citotoxicidade no tecido-alvo (ver pontos 54-55). Se os resultados positivos ou ambíguos ocorrerem apenas em conjunto com provas claras de citotoxicidade, concluir-se-á que o estudo é inconclusivo no respeitante à genotoxicidade, exceto se existirem informações suficientes que apoiem uma conclusão definitiva. Em caso de resultado negativo num contexto de sinais de toxicidade em todas as doses ensaiadas, pode ser aconselhável realizar um estudo complementar com doses não tóxicas.

Relatório do ensaio

Elementos a incluir no relatório de ensaio:

Produto químico em estudo:

— proveniência, número do lote, se disponíveis;

— estabilidade do produto químico em estudo, data-limite de utilização ou data de reanálise, se conhecidas.

Substância monocomponente:

— aspeto físico, solubilidade em água e outras propriedades físico-químicas relevantes;

— dados de identificação química, como as denominações IUPAC ou CAS, número CAS, código SMILES ou InChI, fórmula estrutural, pureza, identidade química das impurezas, se justificado e exequível, etc.

Substância multicomponentes, UVCB e misturas:

— caracterização, na medida do possível, da identidade química (ver acima), da ocorrência quantitativa e das propriedades físico-químicas relevantes dos componentes.

Solvente/veículo:

— justificação para a escolha do solvente/veículo;

— solubilidade e estabilidade do produto químico em estudo no solvente/veículo, se conhecidas;

— preparação das formulações de doses;

— determinações analíticas com essas fórmulas (p. ex.: estabilidade, homogeneidade, concentrações nominais).

Animais utilizados no ensaio:

— espécie/estirpe utilizada; justificações científica e ética da escolha;

— número, idade e sexo;

— proveniência, condições de alojamento, dieta, etc.;

— peso de cada animal no início e no final do ensaio, incluindo o intervalo de pesos corporais, a média e o desvio-padrão para cada grupo.

Condições de realização do ensaio:

— controlos positivos e negativos (veículo/solvente);

▼M7

— resultados de um eventual estudo para definição da gama de doses;

— fundamentação da escolha das doses;

— detalhes da preparação do produto químico em estudo;

— elementos relativos à administração do produto químico em estudo;

— justificação da via de administração escolhida;

— local de injeção (estudos com administração subcutânea ou intravenosa);

— métodos de preparação das amostras (se conhecidos) e análises histopatológicas, sobretudo para os produtos químicos com resultado positivo no ensaio dos cometas;

— fundamento da seleção dos tecidos;

— métodos para verificar se o produto químico em estudo atingiu o tecido-alvo ou a circulação geral, caso se obtenham resultados negativos;

— dose real (mg/kg de peso corporal/dia), calculada a partir da concentração do produto químico em estudo nos alimentos ou na água potável (ppm) e do consumo, se aplicável;

— pormenores relativos à qualidade dos alimentos e da água.

— descrição detalhada da exposição e do programa de colheita de amostras e justificação das escolhas feitas (p. ex., eventuais dados toxicocinéticos);

— método de alívio da dor (analgesia);

— método de eutanásia;

— procedimentos para o isolamento e a preservação de tecidos;

— métodos de preparação da suspensão de células/núcleos;

— proveniência e números de lote de todos os reagentes (se possível);

— métodos de avaliação da citotoxicidade;

— condições de eletroforese;

— técnicas de coloração utilizadas;

— métodos de contagem e classificação dos «cometas»

Resultados:

— eventuais observações clínicas de caráter geral, antes e ao longo do período de ensaio, para cada animal;

— provas de citotoxicidade, caso existam;

▼M7

— para estudos de duração superior a uma semana: peso de cada animal durante o ensaio, incluindo a gama de pesos corporais, a média e o desvio-padrão para cada grupo; consumo de alimentos;

— relação dose-resposta, quando se possa determinar;

— para cada tecido ou cada animal, percentagem de ADN de «cauda» (ou outros parâmetros, se escolhidos); valores medianos por lâmina; valores médios por animal e por grupo;

— dados históricos e simultâneos sobre o controlo negativo, com intervalos, médias/medianas e desvios-padrão, para cada tecido estudado;

— dados relativos ao controlo positivo realizado em paralelo com o ensaio e dados históricos sobre o controlo positivo,

— para todos os tecidos exceto o fígado, curva dose-resposta decorrente do controlo positivo. Para tal, utilizam-se os dados recolhidos durante a demonstração de competência (ver pontos 16-17), devendo justificar-se, com apoio bibliográfico, a adequação da intensidade e da dispersão das respostas aos controlos efetuados com esse tecido;

— análise estatística e respetivo método; critérios definidos para que o estudo seja considerado positivo, negativo ou inconclusivo;

— frequência de «ouriços» em cada grupo e por animal.

Discussão dos resultados

Conclusões

Referências

REFERÊNCIAS

1) Kirkland, D., G. Speit (2008), Evaluation of the ability of a battery of three *in vitro* genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens III. Appropriate follow-up testing *in vivo*, *Mutation Research*, Vol. 654/2, pp. 114-32.

2) Brendler-Schwaab, S. *et al*. (2005), The *in vivo* Comet assay: use and status in genotoxicity testing, *Mutagenesis*, Vol. 20/4, pp. 245-54.

3) Burlinson, B. *et al*. (2007), Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing: result of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research*, Vol. 627/1, pp. 31-5.

4) Burlinson, B. (2012), The *in vitro* and *in vivo* Comet assays, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 817, pp. 143-63.

5) Smith, C.C. *et al*. (2008), Recommendations for design of the rat Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 23/3, pp. 233-40.

6) Hartmann, A. *et al*. (2003), Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 18/1, pp. 45-51.

7) McKelvey-Martin, V.J. *et al*. (1993), The single cell gel electrophoresis assay (Comet assay): a European review, *Mutation Research*, Vol. 288/1, pp. 47-63.

8) Tice, R.R. *et al*. (2000), Single cell gel/Comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, pp. 206-21.

▼M7

9) Singh, N.P. *et al*. (1988), A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Experimental Cell Research*, Vol. 175/1, pp. 184-91.

10) Rothfuss, A. *et al*. (2010), Collaborative study on fifteen compounds in the rat-liver Comet assay integrated into 2- and 4-week repeat-dose studies, *Mutation Research*, Vol., 702/1, pp. 40-69.

11) OCDE (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OCDE, Paris.

12) OCDE (2014), *Reports of the JaCVAM initiative international pre-validation and validation studies of the in vivo rodent alkaline comet assay for the detection of genotoxic carcinogens*, Series on Testing and Assessment, Nos. 195 and 196, OECD Publishing, Paris.

13) Olive, P.L., J.P. Banath, R.E. Durand (1990), Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells using the «Comet» assay, *Radiation Research*, Vol. 122/1, pp. 86-94.

14) Tice, R.R., G.H. Strauss (1995), The single cell gel electrophoresis/Comet assay: a potential tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans, *Stem Cells*, Vol. 13/1, pp. 207-14.

15) Collins, A.R (2004), The Comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations, *Molecular Biotechnology*, Vol. 26/3, pp. 249-61.

16) Rothfuss, A. *et al*. (2011), Improvement of *in vivo* genotoxicity assessment: combination of acute tests and integration into standard toxicity testing, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 723/2, pp. 108-20.

17) Kushwaha, S. *et al*. (2010), Evaluation of multi-organ DNA damage by Comet assay from 28 days repeated dose oral toxicity test in mice: A practical approach for test integration in regulatory toxicity testing, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, Vol. 58/1, pp. 145–54.

18) Vasquez, M.Z. (2010), Combining the *in vivo* Comet and micronucleus assays: a practical approach to genotoxicity testing and data interpretation, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, pp. 187-99.

19) Bowen, D.E. (2011), Evaluation of a multi-endpoint assay in rats, combining the bone-marrow micronucleus test, the Comet assay and the flow-cytometric peripheral blood micronucleus test, *Mutation Research*, Vol. 722/1, pp. 7-19.

20) Recio, L. *et al*. (2010), Dose-response assessment of four genotoxic chemicals in a combined mouse and rat micronucleus (MN) and Comet assay protocol, *The Journal of Toxicological Science*, Vol. 35/2, pp. 149-62.

21) O'Donovan, M., B. Burlinson (2013), Maximum dose levels for the rodent comet assay to examine damage at the site of contact or to the gastrointestinal tract, *Mutagenesis*, Vol. 28/6, pp. 621-3.

22) Hartmann, A. (2004), **Use of the alkaline *in vivo* Comet assay for mechanistic genotoxicity investigations,** *Mutagenesis*, Vol. 19/1, pp. 51-9.

23) Nesslany, F. (2007), *In vivo* Comet assay on isolated kidney cells to distinguish genotoxic carcinogens from epigenetic carcinogens or cytotoxic compounds, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 630/1, pp. 28-41.

24) Brendler-Schwaab, S.Y., B.A. Herbold (1997), A new method for the enrichment of single renal proximal tubular cells and their first use in the Comet assay, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 393/1-2, pp. 175-8.

▼M7

25) Toyoizumi, T. *et al*. (2011), Use of the *in vivo* skin Comet assay to evaluate the DNA-damaging potential of chemicals applied to the skin, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 726/2, pp. 175-80.

26) Struwe, M. *et al*. (2008), Detection of photogenotoxicity in skin and eye in rat with the photo Comet assay, *Photochemical and Photobiological Sciences*, Vol. 7/2, pp. 240-9.

27) Wada, K. *et al*. (2012), A comparison of cell-collecting methods for the Comet assay in urinary bladders of rats, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 742/1-2, pp. 26-30.

28) Wang, A. *et al*. (2007), Measurement of DNA damage in rat urinary bladder transitional cells: improved selective harvest of transitional cells and detailed Comet assay protocols, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 634/ 1-2, pp. 51-9.

29) Burlinson, B. *et al*. (2007), *In Vivo* Comet Assay Workgroup, part of the Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 627/1, pp. 31-5.

30) Jackson, P. *et al*. (2012), Pulmonary exposure to carbon black by inhalation or instillation in pregnant mice: effects on liver DNA strand breaks in dams and offspring, *Nanotoxicology*, Vol. 6/5, pp. 486-500.

31) Sasaki, Y.F. *et al*. (2000), The comet assay with multiple mouse organs: comparison of Comet assay results and carcinogenicity with 208 chemicals selected from the IARC monographs and U.S. NTP Carcinogenicity Database, *Critical Reviews in Toxicology*, Vol. 30/6, pp. 629-799.

32) Sekihashi, K. *et al*. (2002), Comparative investigations of multiple organs of mice and rats in the Comet assay, *Mutation Research*, Vol. 517/1-2, pp. 53--74.

33) Speit, G, M. Vasquez, A. Hartmann (2009), **The comet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity,** *Mutation Research*, Vol. 681/1, pp. 3--12.

34) Zheng, H., P.L. Olive (1997), Influence of oxygen on radiation-induced DNA damage in testicular cells of C3H mice, *International Journal of Radiation Biology*, Vol. 71/3, pp. 275-282.

35) Cordelli, E. *et al*. (2003), Evaluation of DNA damage in different stages of mouse spermatogenesis after testicular X irradiation, *Journal of Radiation Research*, Vol. 160/4, pp. 443-451.

36) Merk, O., G. Speit (1999), Detection of crosslinks with the Comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 33/2, pp. 167-72.

37) Pfuhler, S., H.U. Wolf (1996), Detection of DNA-crosslinking agents with the alkaline Comet assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 27/3, pp. 196-201.

38) Wu, J.H., N.J. Jones (2012), Assessment of DNA interstrand crosslinks using the modified alkaline Comet assay, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 817, pp. 165-81.

39) Spanswick, V.J., J.M. Hartley, J.A. Hartley (2010), **Measurement of DNA interstrand crosslinking in individual cells using the Single Cell Gel Electrophoresis (Comet) assay,** *Methods in Molecular Biology*, Vol. 613, pp. 267-282.

▼M7

40) Kumaravel, T.S., A.N. Jha (2006), Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionizing radiation and chemicals, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 605(1-2), pp. 7-16.

41) Burlinson, B. *et al*. (2007), Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing: result of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research*, Vol.627/1, pp. 31-5.

42) Kumaravel, T.S. *et al*. (2009), Comet Assay measurements: a perspective, *Cell Biology and Toxicology*, Vol. 25/1, pp. 53-64.

43) Ersson, C., L. Möller (2011), The effects on DNA migration of altering parameters in the Comet assay protocol such as agarose density, electrophoresis conditions and durations of the enzyme or the alkaline treatments, *Mutagenesis*, Vol. 26/6, pp. 689-95.

44) Møller, P. *et al*. (2010), Assessment and reduction of Comet assay variation in relation to DNA damage: studies from the European Comet Assay Validation Group, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, pp. 109-11.

45) Forchhammer, L. *et al*. (2010), Variation in the measurement of DNA damage by Comet assay measured by the ECVAG inter-laboratory validation trial, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, pp. 113-23.

46) Azqueta, A. *et al*. (2011), Towards a more reliable comet assay: Optimising agarose concentration, unwinding time and electrophoresis conditions, *Mutation Research*, Vol. 724/1-2, pp. 41-45.

47) Hayashi, M. *et al*. (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, *Mutation Research*, Vol. 723/2, pp. 87-90.

48) Ryan, T. P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement,* John Wiley and Sons, New York 2nd ed.

49) Appendix A of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS No. 123)

50) Capítulo B.8 do presente anexo: *Toxicidade subaguda por inalação: estudo de 28 dias*.

51) Capítulo B.29 do presente anexo: *Toxicidade subcrónica por inalação: estudo de 90 dias*.

52) Blakey, D.H., G.R. Douglas (1984), Transient DNA lesions induced by benzo[a]pyrene in Chinese hamster ovary cells, *Mutation Research*, Vol. 140/2-3, pp. 141-45.

53) Blakey, D.H., G.R. Douglas (1990), The role of excision repair in the removal of transient benzo[a]pyrene-induced DNA lesions in Chinese hamster ovary cells, *Mutation Research*, Vol. 236/1, pp. 35-41.

54) OCDE (2002), «Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation» OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 19, OECD Publishing, Paris.

55) Nakajima, M. (2012), Tissue sample preparation for *in vivo* rodent alkaline Comet assay, *Genes and Environment*, Vol. 34/1, pp. 50-4.

56) Hartmann, A. *et al*. (2003), Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay, *Mutagenesis*, Vol.18/1, pp.45–51.

57) Atlas of Comet Assay Images, Scientist Press Co., Ltd., Tokyo, Japan.

58) Lovell, D.P., G. Thomas, R. Dubow (1999), Issues related to the experimental design and subsequent statistical analysis of *in vivo* and *in vitro* Comet studies, *Teratogenesis Carcinogenesis Mutagenesis*, Vol. 19/2, pp. 109-19.

▼**M7**

59) Wiklund, S.J., E. Agurell (2003), Aspects of design and statistical analysis in the Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 18/2, pp. 167-75.

60) Bright, J. *et al*. (2011), Recommendations on the statistical analysis of the Comet assay, *Pharmaceutical Statistics*, Vol. 10/6, pp. 485-93.

61) Lovell, D.P., T. Omori (2008), Statistical issues in the use of the Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 23/3, pp. 171-82.

▼M7

Apêndice 1

DEFINIÇÕES

Eletroforese em gel de células isoladas, em meio alcalino: Técnica sensível para a deteção de lesões primárias do ADN em células individuais ou núcleos.

Produto químico: Substância ou mistura.

«Cometa»: Forma adquirida pelos nucleoides após serem sujeitos a um campo electroforético; a designação deve-se à semelhança com os cometas (a «cabeça» é o núcleo e a «cauda» é constituída pelo ADN que se deslocou para fora do núcleo, por ação do campo elétrico).

Variável crítica/parâmetro crítico: Protocolo variável em cujo contexto uma pequena alteração pode ter grande impacto na conclusão do ensaio. As variáveis críticas podem ser específicas dos tecidos. Não devem ser alteradas, em especial no contexto de um ensaio, sem ter em conta as eventuais consequências da alteração no resultado do ensaio, expressas, p. ex., na amplitude e na variabilidade dos controlos positivos e negativos. O relatório de ensaio deve incluir a lista de alterações das variáveis críticas efetuadas durante o ensaio ou em comparação com o protocolo normalizado aplicado pelo laboratório, com uma justificação para cada alteração.

Intensidade da «cauda» ou percentagem de ADN de «cauda»: Corresponde à intensidade da «cauda» em relação à intensidade do «cometa» total («cabeça» e «cauda»). Reflete a extensão da quebra de ADN, expressa em percentagem.

Produto químico em estudo: qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado o presente método de ensaio.

UVCB: Substâncias de composição desconhecida ou variável, produtos de reação complexos ou materiais biológicos.

▼M7

Apêndice 2

MODELO FATORIAL PARA IDENTIFICAR DIFERENÇAS ENTRE SEXOS NO ENSAIO DOS COMETAS *IN VIVO*

Conceção multifatorial e sua análise

Este modelo utiliza, no mínimo, 5 machos e 5 fêmeas para cada concentração, totalizando, no mínimo, 40 animais (20 machos e 20 fêmeas, além dos controlos positivos pertinentes).

O modelo, que constitui uma das conceções multifatoriais mais simples, equivale a uma análise de variância bidirecional, em que o sexo e a concentração são os principais efeitos. Os dados podem ser analisadas por vários pacotes normalizados de *software* estatístico, como SPSS, SAS, STATA e Genstat, bem como por recurso ao parâmetro R.

A análise discrimina, no conjunto de dados, a variabilidade entre os sexos, a variabilidade entre as concentrações e a variabilidade ligada à interação entre os sexos e as concentrações. Cada um dos termos é testado em função da variabilidade entre os animais replicados nos grupos do mesmo sexo, para a mesma concentração. Estão disponíveis em muitos manuais de estatística (ver referências), bem como na função «ajuda» dos pacotes estatísticos, dados pormenorizados relativos à metodologia em causa.

A análise consiste em confrontar o termo da interação sexo-concentração no quadro ANOVA ([1]). Na ausência de um termo de interação significativo, os valores combinados entre os sexos ou as concentrações proporcionam provas estatísticas válidas entre as concentrações, com base nas que são agrupadas no termo de variabilidade dos grupos ANOVA.

A análise prossegue repartindo a estimativa da variabilidade entre as concentrações por contrastes, o que proporciona uma melhor abordagem dos contrastes lineares e quadráticos das respostas às concentrações. Quando existe uma interação significativa sexo-concentração, este termo pode igualmente ser cindido no contraste de interação linear em função do sexo e no contraste de interação quadrática em função do sexo. Ambos os termos em causa permitem determinar se as respostas às concentrações são paralelas para ambos os sexos ou se há resposta diferencial entre estes.

A estimativa do agrupamento no contexto da variabilidade do grupo pode ser utilizada como teste par-a-par da diferença entre as médias. As comparações podem ser feitas entre as médias para ambos os sexos e as médias para a concentração diferente, bem como entre as concentrações do controlo negativo. Caso haja uma interação significativa, podem fazer-se comparações entre as médias de várias concentrações, com um só sexo, ou entre as médias dos sexos para a mesma concentração.

REFERÊNCIAS

Muitos manuais de estatística abordam a teoria, a conceção, a metodologia, a análise e a interpretação de abordagens fatoriais, que vão desde a forma mais simples (bifatorial) às formas mais complexas utilizadas na metodologia de ensaio. Apresenta-se a seguir uma lista não exaustiva. Algumas publicações dão exemplos concretos de abordagens comparáveis, incluindo, por vezes, o código para efetuar as análises por recurso a vários pacotes de *software*.

([1]) Os estatísticos que adotem uma metodologia de modelização como a dos modelos lineares gerais (GLM) podem realizar esta análise de uma forma diferente, embora comparável, sem utilizarem necessariamente o tradicional quadro ANOVA, que, para os cálculos estatísticos, recorre a métodos algorítmicos da era pré-informática.

▼**M7**

1) Box, G.E.P, Hunter, W.G. and Hunter, J.S. (1978). Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building. New York: John Wiley & Sons.

2) Box G.E.P. & Draper, N.R. Empirical model-building and response surfaces. John Wiley & Sons Inc.

3) Doncaster, C.P. & Davey, A.J.H. Analysis of Variance and Covariance: How to Choose and Construct Models for the Life Sciences. Cambridge University Press.

4) Mead, R. (1990) The Design of Experiments. Statistical principles for practical application. Cambridge University Press.

5) Montgomery D.C. (1997) Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons Inc.

6) Winer, B.J. Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill.

7) Wu, C.F.J & Hamada, M.S. (2009). Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc.

▼M7

Apêndice 3

LIMITAÇÕES ATUAIS DO ENSAIO

No estado atual dos conhecimentos, o ensaio dos cometas *in vivo* apresenta várias limitações. Espera-se que, à medida que se acumule experiência com a aplicação do ensaio, estas limitações sejam reduzidas ou definidas com maior precisão, de modo a responder às questões de segurança num contexto regulamentar.

1. Alguns tipos de lesões do ADN podem ser de curta duração, ou seja, as lesões podem ser reparadas depressa de mais para permanecerem detetáveis 24 horas ou mais após a administração da última dose. Não há nenhuma lista dos tipos identificáveis de danos de curta duração, nem dos produtos químicos suscetíveis de provocar esse tipo de danos, nem se conhece o período durante o qual os danos em causa podem ser detetados. O tempo de amostragem ótimo pode também depender do produto químico ou da via de exposição, pelo que os tempos de amostragem devem ser determinados a partir de dados cinéticos (p. ex., T_{max}, no qual é atingido o pico de concentração no plasma ou no tecido), sempre que esses dados estiverem disponíveis. Na sua maioria, os estudos de validação que fundamentam o presente método de ensaio preconizam a realização da autópsia 2 ou 3 horas após a administração da última dose. Na sua maioria, os estudos publicados referem a administração da última dose entre 2 e 6 horas antes da eutanásia. Estes estudos constituíram a base para a recomendação (constante do método de ensaio) de que, na ausência de dados que indiquem o contrário, a última dose deve ser administrada num determinado momento entre 2 e 6 horas antes da autópsia.

2. Não há dados de estudos identificáveis que analisem a sensibilidade do método de ensaio para deteção de lesões de curta duração no ADN após a administração de alimentos ou de água, em comparação com a administração por sonda esofágica. Detetaram-se danos no ADN após a administração de produtos químicos nos alimentos e na água, mas as ocorrências comunicadas são relativamente poucas, em comparação com os casos de administração por sonda esofágica e por via intraperitoneal. Portanto, a sensibilidade do ensaio pode ser reduzida no caso de produtos químicos administrados através dos alimentos ou da água que provoquem danos efémeros.

3. Não foram realizados estudos interlaboratoriais com outros tecidos além do fígado e do estômago, pelo que não se pôde estabelecer nenhuma recomendação quanto ao modo de obter uma resposta sensível e reprodutível em outros tecidos além do fígado, nomeadamente no que respeita às gamas previstas de controlo positivo e negativo. Relativamente ao fígado, também não foi possível chegar a acordo sobre a fixação de um limite inferior para o valor de controlo negativo.

4. Embora vários artigos publicados demonstrem que o estudo da citotoxicidade *in vitro* pode levar a conclusões confusas, publicaram-se pouquíssimos dados relativos a ensaios *in vivo*, pelo que não é possível recomendar nenhuma medida de citotoxicidade. As alterações histopatológicas como a inflamação, a infiltração de células ou as alterações apoptóticas ou necróticas foram associadas a aumentos na migração do ADN; no entanto, o ensaio de validação JaCVAM demonstrou (OCDE, 2014) que essas alterações nem sempre resultam em resultados positivos no ensaio dos cometas, pelo que não existe nenhuma lista definitiva de alterações histopatológicas sistematicamente associável ao aumento da migração de ADN. Foi já sugerida a possibilidade de considerar os «ouriços» (também chamados «nuvens» ou células-fantasma) indicadores de citotoxicidade, embora a sua etiologia seja incerta. Há dados indicativos de que podem ser causados por citotoxicidade de origem química, por danos mecânicos ou de natureza enzimática iniciados durante a preparação da amostra (Guerard *et al*., 2014) e/ou por um efeito de genotoxicidade mais intenso do produto químico em estudo. Outros dados parecem mostrar que são devidos a lesões extensas, mas eventualmente reparáveis, no ADN (Lorenzo *et al*., 2013).

▼M7

5. Alguns tecidos e núcleos de células foram congelados com êxito para análise posterior. Este processo produz, em geral, um efeito mensurável na resposta ao veículo e no controlo positivo (Recio *et al.,*., 2010; Gerberick et al. (2012). Gerberick et al. (2013). Se for utilizado, o laboratório deve demonstrar competência no domínio das metodologias de congelamento e confirmar a obtenção de gamas suficientemente baixas de percentagens de ADN de «cauda» nos tecidos-alvo dos animais expostos ao veículo, de forma a que continuem a ser detetáveis respostas positivas. A literatura especializada descreve o congelamento de tecidos por recurso a diversos métodos. Todavia, não existe ainda consenso quanto à melhor forma de congelar e descongelar tecidos, bem como de avaliar se uma resposta potencialmente alterada pode afetar a sensibilidade do ensaio.

6. Alguns trabalhos recentes demonstram que a lista das variáveis críticas deverá continuar a reduzir-se e que os parâmetros das variáveis críticas serão definidos de forma mais precisa (Guerard et al., 2014).

Referências

1) Guerard, M., C. Marchand, U. Plappert-Helbig (2014), Influence of Experimental Conditions on Data Variability in the Liver Comet Assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 55/2, pp. 114-21.

2) GJackson, P. *et al*. (2013), Validation of use of frozen tissues in high-throughput comet assay with fully-automatic scoring, *Mutagenesis*, Vol. 28/6, pp. 699-707.

3) Lorenzo, Y. *et al*. (2013), **The comet assay, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity: hedgehogs are not always dead,** *Mutagenesis*, Vol. 28/4, pp. 427-32.

4) OCDE (2014), *Reports of the JaCVAM initiative international pre-validation and validation studies of the in vivo rodent alkaline comet assay for the detection of genotoxic carcinogens*, Series on Testing and Assessment, Nos. 195 and 196, OECD Publishing, Paris.

5) Recio L, Hobbs C, Caspary W, Witt KL, (2010), Dose-response assessment of four genotoxic chemicals in a combined mouse and rat micronucleus (MN) and Comet assay protocol, *J. Toxicol. Sci.* 35:149-62.

6) Recio, L. *et al*. (2012), Comparison of Comet assay dose-response for ethyl methanesulfonate using freshly prepared versus cryopreserved tissues, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 53/2, pp. 101-13.

▼M8

B.63. ENSAIO DE TOXICIDADE PARA A REPRODUÇÃO/O DESENVOLVIMENTO

INTRODUÇÃO

1. O presente método de ensaio é equivalente à *Test Guideline* 421 (2016) da OCDE. As diretrizes da OCDE para o ensaio de produtos químicos são revistas periodicamente à luz do progresso científico. A diretriz n.º 421 para os testes de rastreio inicial foi adotada em 1995, com base num protocolo «ensaio preliminar de despistagem da toxicidade para a reprodução/o desenvolvimento», debatido em duas reuniões de peritos, realizadas em Londres, em 1990, (1) e em Tóquio, em 1992 (2).

2. O presente método de ensaio foi atualizado com parâmetros relativos a perturbadores do sistema endócrino, na sequência da atividade da OCDE altamente prioritária, iniciada em 1998, de revisão das diretrizes de ensaio existentes e elaboração de novas orientações para a análise e o ensaio de possíveis perturbadores do sistema endócrino (3). Neste contexto, a TG 407 da OCDE (estudo de toxicidade pela repetição de uma dose oral durante 28 dias em roedores – capítulo B.7 do presente anexo) foi enriquecida em 2008 com parâmetros adequados para detetar a atividade endócrina de produtos químicos em estudo. O objetivo da atualização da *Test Guideline* 421 era incluir alguns parâmetros importantes no rastreio dos perturbadores do sistema endócrino nas *Test Guideline* cujos períodos de exposição abrangem alguns dos períodos sensíveis do desenvolvimento (período pré-natal e primeira fase do período pós-natal).

3. Os restantes parâmetros aplicáveis aos perturbadores do sistema endócrino selecionados, igualmente incluídos na *Test Guideline* 443 (estudo alargado da toxicidade reprodutiva numa geração – capítulo B.56 deste anexo) foram incluídos na *Test Guideline* 421 com base num estudo de viabilidade sobre as questões científicas e técnicas, bem como em eventuais adaptações da conceção do ensaio necessárias à sua inclusão (4).

4. O presente método de ensaio destina-se a gerar informações limitadas sobre os efeitos de um produto químico em estudo no desempenho reprodutor masculino e feminino, como a função gonadal, o comportamento de acasalamento, a fecundação e o desenvolvimento do feto e o parto. Não constitui uma alternativa aos métodos de ensaio B.31, B.34, B.35 ou B.56, nem os substitui.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

5. O presente método de ensaio pode ser utilizado para fornecer informações preliminares sobre possíveis efeitos na reprodução e/ou no desenvolvimento, quer numa fase inicial da avaliação das propriedades toxicológicas dos produtos químicos, quer sobre produtos químicos que suscitem preocupação. Pode também ser utilizado no âmbito de um conjunto de ensaios preliminares com produtos químicos existentes sobre os quais se disponha de pouca ou nenhuma informação toxicológica, como estudo exploratório de determinação da gama de dosagens para estudos mais exaustivos sobre a reprodução/o desenvolvimento, ou sempre que for considerado importante. Na realização do estudo, deverão seguir-se os princípios de orientação e as considerações descritas no documento de orientação 19 da OCDE quanto ao reconhecimento, avaliação e utilização dos sinais clínicos como parâmetros extrapoláveis aos seres humanos para experiências com animais utilizados em avaliações de segurança (5).

▼M8

6. O presente método de ensaio não fornece informações completas sobre todos os aspetos da reprodução e do desenvolvimento. Faculta apenas, nomeadamente, meios limitados de deteção de manifestações pós-natais de exposição pré-natal ou de efeitos que possam ser induzidos durante a exposição pós-natal. Devido, entre outros motivos, ao número relativamente reduzido de animais dos grupos de dosagem, à seletividade dos parâmetros e à curta duração do estudo, o método não fornece dados que apoiem a declaração definitiva de inexistência de efeitos. Além disso, na ausência de dados de outros ensaios de toxicidade para a reprodução/o desenvolvimento, os resultados positivos são úteis para a avaliação preliminar dos perigos e contribuem para informar as decisões relativas à necessidade e à oportunidade de ensaios adicionais.

7. Os resultados correspondentes aos parâmetros relacionados com o sistema endócrino devem interpretar-se com base no documento *Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals* (6), elaborado pela OCDE, que estabelece um quadro conceptual para o ensaio e a avaliação de produtos químicos perturbadores do sistema endócrino. Nesse quadro, o método correspondente à *Test Guideline* 421 da OCDE melhorada consta do nível 4, como ensaio *in vivo* que fornece dados sobre efeitos nocivos nos parâmetros pertinentes do sistema endócrino. Contudo, um sinal do sistema endócrino não pode, por si só, ser considerado prova suficiente de que o produto em causa é perturbador do sistema endócrino.

8. O presente método prevê a administração por via oral do produto químico em estudo. Poderá ser necessário introduzir alterações se forem utilizadas outras vias de exposição.

9. Antes da aplicação do método de ensaio a uma mistura para obter dados com fins normativos, importa ponderar se – e, em caso afirmativo, por que motivo – o método pode proporcionar resultados adequados para o efeito. Essas considerações não são necessárias se existir um requisito normativo para o ensaio da mistura.

10. Definem-se no apêndice 1 alguns conceitos utilizados.

PRINCÍPIO DO ENSAIO

11. O produto químico em estudo é administrado, em doses escalonadas, a vários grupos de machos e fêmeas. Os machos devem ser tratados durante, pelo menos, quatro semanas – até ao dia anterior ao da eutanásia, inclusive –, o que abrange um mínimo de duas semanas antes do acasalamento, o período de acasalamento e aproximadamente duas semanas após este. Tendo em conta o período limitado de dosagem antes do acasalamento dos machos, a fertilidade não pode constituir um indicador particularmente sensível da toxicidade testicular. Por conseguinte, é essencial um exame histológico pormenorizado dos testículos. A combinação de um período de dosagem pré-acasalamento de duas semanas e de observações subsequentes de acasalamento/fertilidade com um período global de dosagem de, pelo menos, quatro semanas, seguido de histopatologia pormenorizada das gónadas do macho, é considerada suficiente para permitir a deteção da maioria dos efeitos na fertilidade masculina e na espermatogénese.

12. As fêmeas devem ser tratadas ao longo de todo o estudo – ou seja, duas semanas antes do acasalamento –, com o objetivo de abranger, pelo menos, dois ciclos éstricos completos, o período variável até à fecundação, a duração da gravidez e, pelo menos, treze dias após o parto, até ao dia anterior ao da eutanásia, inclusive.

13. A duração do estudo após a aclimatação, com uma avaliação do ciclo éstrico antes do início do tratamento, depende do desempenho das fêmeas, e é de cerca de 63 dias [pelo menos 14 dias antes do acasalamento, até 14 dias de acasalamento, 22 dias de gestação, 13 dias de aleitamento].

▼M8

14. No período de administração, deve verificar-se atentamente, todos os dias, se os animais evidenciam sinais de toxicidade. Os animais que morrem ou são eutanasiados durante o ensaio são autopsiados; no final do ensaio, são eutanasiados e autopsiados os animais sobreviventes.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Seleção de espécies animais

15. O presente método de ensaio foi concebido para ratazanas. Se os parâmetros que nele se especificam forem estudados noutra espécie de roedor, essa opção deve ser justificada pormenorizadamente. No programa de validação internacional para a deteção de perturbadores do sistema endócrino com base na TG 407 da OECD (correspondente ao capítulo B.7 do presente anexo), as ratazanas foram a única espécie utilizada. Deve evitar-se o recurso a estirpes de fecundidade baixa ou com uma incidência elevada de deficiências de desenvolvimento. Devem utilizar-se animais virgens saudáveis, não sujeitos a experiências anteriores, e especificar-se a espécie, a estirpe, o sexo, o peso e/ou a idade dos animais. No início do estudo, a diferença de peso entre os animais deve ser mínima, não devendo exceder 20 % do peso médio dos animais de cada sexo. Nos casos em que for realizado como estudo preliminar de um estudo a longo prazo ou de geração, é preferível utilizar animais da mesma estirpe e proveniência em ambos os estudos.

Condições de alojamento e de alimentação

16. Todos os procedimentos devem respeitar as normas locais de manipulação de animais de laboratório. A temperatura do compartimento experimental dos animais deve ser de 22 °C (±3). A humidade relativa deve estar compreendida entre 50 % e 60 %, embora sejam aceitáveis valores compreendidos entre 30 %, no mínimo, e um valor máximo que, preferencialmente, não deve exceder 70 %, salvo durante os períodos de limpeza do biotério. A iluminação deve ser artificial, com uma sequência de 12 horas de luz seguidas de 12 horas de escuridão. Para a alimentação, podem ser usadas dietas convencionais de laboratório, com acesso ilimitado a água potável. A escolha da dieta pode depender da necessidade de garantir uma mistura adequada do produto químico em estudo, quando administrado por essa via.

17. Os animais devem ser alojados em pequenos grupos do mesmo sexo. Podem ser alojados individualmente, se tal se justificar do ponto de vista científico. Em caso de alojamento coletivo, cada gaiola não deve alojar mais de cinco animais. O acasalamento deve ocorrer em gaiolas adequadas para o efeito. As fêmeas prenhes devem ser colocadas em gaiolas individuais e dispor de materiais de nidificação. As fêmeas em lactação devem ser colocadas em gaiolas individuais com as crias.

18. Deve efetuar-se com regularidade uma pesquisa de contaminantes nos alimentos fornecidos e conservar-se uma amostra da dieta até o relatório estar concluído.

Preparação dos animais

19. Distribuem-se aleatoriamente animais adultos, jovens e saudáveis pelos grupos de controlo e pelos grupos expostos. As gaiolas devem estar dispostas de forma a minimizar possíveis efeitos derivados do seu posicionamento. Os animais são identificados de forma inequívoca, devendo ser aclimatados às condições de laboratório durante, pelo menos, cinco dias antes do início do estudo.

Preparação das doses

20. Recomenda-se que a consulta do PON pertinente aquando da implementação e utilização de um desses modelos no laboratório. Se for selecionada a via oral, o produto químico em estudo é geralmente administrado por gavagem; no entanto, os produtos químicos em estudo podem ser administrados através dos alimentos ou da água de beber.

▼M8

21. Quando necessário, o produto químico em estudo pode ser dissolvido ou suspenso num veículo adequado. Sempre que possível, recomenda-se, como primeira opção, uma solução ou suspensão aquosa; caso isso não seja viável, pode optar-se por uma solução ou emulsão num óleo (por exemplo, em óleo de milho); em último caso, pode recorrer-se a uma solução noutro veículo. Se este não for aquoso, devem conhecer-se as suas características tóxicas. Importa determinar a estabilidade e a homogeneidade do produto químico em estudo no veículo.

PROCEDIMENTO

Número e sexo dos animais

22. Recomenda-se que cada grupo seja iniciado com, pelo menos, 10 machos e 12-13 fêmeas. As fêmeas serão avaliadas para pré-exposição do ciclo éstrico; os animais que não apresentem ciclos típicos de 4-5 dias não são incluídos no estudo. Assim, é recomendável utilizar um número mais elevado de fêmeas, a fim de assegurar a presença de 10 fêmeas reprodutoras em cada grupo. Exceto no caso de efeitos tóxicos marcados, prevê-se que o número de fêmeas prenhes por grupo seja, no mínimo, igual a 8, que, normalmente, é o número mínimo aceitável de fêmeas prenhes por grupo. O objetivo é produzir gravidezes e crias em número suficiente para assegurar uma avaliação significativa do potencial do produto químico em estudo para afetar a fertilidade, a gravidez, o comportamento materno e de aleitamento, o crescimento e o desenvolvimento da geração F_1, desde a conceção até ao dia 13 pós-parto.

Dosagem

23. De modo geral, devem utilizar-se, no mínimo, três lotes de ensaio e um lote de controlo. As doses podem basear-se em informações dos ensaios de toxicidade aguda ou em resultados de estudos de dose repetida. Salvo no que respeita à exposição ao produto químico em estudo, os animais dos grupos de controlo devem ser tratados do mesmo modo que os animais dos grupos ensaiados. Se for utilizado um veículo para administrar o produto químico em estudo, o grupo de controlo deve receber o volume máximo de veículo utilizado.

24. Na seleção das doses devem ter-se em conta os dados eventualmente disponíveis em matéria de toxicidade e toxicocinética. Deve também ter-se em conta o facto de poder haver diferenças de sensibilidade entre animais prenhes e não prenhes. Importa escolher como dose mais elevada uma dose que induza efeitos tóxicos, mas não cause mortalidade nem sofrimento intenso. Deve selecionar-se uma sequência descendente de doses que permita detetar qualquer resposta relacionada com estas e determinar o nível sem efeito nocivo observável (NSEAO) à dose mais baixa. A inclusão de um quarto grupo de ensaio é muitas vezes preferível ao uso de intervalos muito grandes (fatores superiores a 10) entre as dosagens.

25. Caso se observem sinais de toxicidade generalizada (por exemplo, redução do peso corporal, efeitos ao nível hepático, cardíaco, pulmonar ou renal, etc.) ou outras alterações que possam não ser reações tóxicas (por exemplo, diminuição da quantidade de alimentos ingerida, dilatação hepática, etc.), deverá interpretar-se com cautela qualquer efeito ao nível dos parâmetros endócrinos.

Ensaio no limite

26. Se um estudo oral com uma dose de, pelo menos, 1 000 mg/kg de peso corporal/dia – ou, no caso da administração por via alimentar ou pela água de beber, de uma percentagem equivalente na alimentação ou na água de beber –, utilizando os procedimentos descritos para o estudo, não produzir efeitos tóxicos observáveis e, com base nos dados relativos a substâncias estruturalmente afins, não for de esperar efeitos tóxicos, poderá não ser necessário efetuar um estudo completo com várias doses. O ensaio-limite é sempre válido, exceto nos casos em que se preveja exposição humana e em que seja necessário testar um nível de dose oral mais elevado. Quando se recorre a outras formas de administração, como a inalação ou a aplicação cutânea, as propriedades físico-químicas do produto químico de ensaio são muitas vezes indicativas e limitativas do nível máximo de exposição praticável.

▼M8

Administração das doses

27. Os animais são tratados diariamente com o produto químico em estudo durante 7 dias por semana. A administração forçada por meio de uma sonda esofágica deve efetuar-se numa dose única, utilizando um tubo estomacal ou uma cânula de intubação adequada. O volume máximo de líquido administrado em cada operação depende das dimensões do animal, não devendo exceder 1 ml/100 g de massa corporal, exceto no caso de soluções aquosas, em que podem administrar-se 2 ml/100 g de massa corporal. Exceto para produtos químicos irritantes ou corrosivos, que normalmente produzem efeitos exacerbados em concentrações superiores, a variabilidade no volume de ensaio deve ser minimizada, ajustando a concentração de modo a garantir um volume constante em todos os níveis de dosagem.

28. No caso de produtos químicos em estudo administrados através da alimentação ou da água de beber, é importante assegurar que as quantidades do produto não interferem com a nutrição normal ou com a composição da água. Se o produto químico em estudo for administrado na alimentação, pode optar-se por concentrações constantes nesta (da ordem das ppm) ou por doses constantes em relação ao peso corporal de cada animal. Caso o produto químico em estudo seja administrado por gavagem, a dose deve ser administrada todos os dias à mesma hora, devendo ajustar-se, pelo menos, uma vez por semana, a fim de se manter uma dose constante em relação ao peso corporal do animal.

Calendário da experiência

29. O tratamento de ambos os sexos deve ter início 2 semanas antes do acasalamento, depois de os animais serem aclimatados durante pelo menos 5 dias e de as fêmeas serem sujeitas a exames de deteção de ciclos éstricos normais (num período de 2 semanas anterior ao tratamento). O estudo deve ser programado de forma a que a avaliação do ciclo éstrico comece pouco depois de os animais terem atingido a plena maturidade sexual, o que pode variar ligeiramente nas diferentes linhagens de ratazanas em laboratórios diferentes, sendo, por exemplo, às 10 semanas nas ratazanas Sprague Dawley e cerca das 12 semanas nas ratazanas Wistar. As mães com crias devem ser eutanasiadas no dia 13 após o parto, ou pouco depois. O dia de nascimento (ou seja, quando o parto é concluído) é definido como o dia 0 após o parto. As fêmeas que não apresentem qualquer indício de copulação são mortas 24 a 26 dias após o último dia do período de acasalamento. O nível de dosagem é mantido em ambos os sexos durante o período de acasalamento. Os machos devem continuar a ser tratados após o período de acasalamento, pelo menos até ter decorrido o período total mínimo de dosagem, de 28 dias. Em seguida, são eutanasiados ou, em alternativa, são mantidos e continuam a ser tratados, para um eventual segundo acasalamento, se isso for considerado adequado.

30. As fêmeas prenhes devem continuar a ser tratadas durante a gravidez e, pelo menos, até ao dia 13 após o parto ou ao dia anterior ao abate. No caso de o produto químico em estudo ser administrado por inalação ou por via cutânea, o tratamento deve continuar a ser administrado pelo menos até ao dia 19 de gestação, inclusive, e retomado o mais rapidamente possível, o mais tardar no dia 4 após o parto.

31. O apêndice 2 apresenta um diagrama do calendário da experiência.

Processo de acasalamento

32. Normalmente, devem ser utilizados neste estudo acasalamentos de 1:1 (um macho e uma fêmea). Pode haver exceções em caso de morte ocasional de machos. A fêmea deve permanecer com o mesmo macho até se observarem indícios de copulação ou terem decorrido duas semanas. Deverão examinar-se as fêmeas todas as manhãs, para verificar a presença de esperma ou de rolhão vaginal. O dia 0 da gravidez é definido como o dia em que houver provas de acasalamento (deteção de rolhão vaginal ou esperma). Se a tentativa de acasalamento for mal sucedida, poderá tentar-se um novo acasalamento das fêmeas com machos do mesmo grupo comprovadamente aptos a procriar.

▼M8

Número de animais por ninhada

33. No dia 4 após o parto, o número de animais de cada ninhada pode ser ajustado eliminando as crias excessivas por seleção aleatória, a fim de se obter, na medida do possível, quatro ou cinco crias por sexo e por ninhada, consoante o tamanho normal das ninhadas das estirpes de ratazanas utilizadas. Devem ser colher-se amostras de sangue de duas das crias excedentárias, que serão agrupadas e utilizadas para a determinação dos níveis do soro T4. Não é adequada a eliminação seletiva das crias, por exemplo, com base no peso corporal ou na distância anogenital (DAG). Sempre que o número de crias do sexo masculino ou feminino impeça a obtenção de quatro ou cinco animais de cada sexo por ninhada, é admissível um ajustamento parcial (por exemplo, seis machos e quatro fêmeas). Não devem ser eliminadas crias se as ninhadas ficarem aquém da meta de abate (8 ou 10 crias/ninhada). Se existir uma única cria além da meta de abate, apenas uma cria deve ser eliminada e utilizada para a colheita de sangue para possíveis avaliações séricas de T4.

34. Se o tamanho da ninhada não for ajustado, eutanasiam-se duas crias por ninhada no dia 4 após o nascimento e são colhidas amostras de sangue para medição das concentrações de hormonas da tiroide. Se possível, essas duas crias de cada ninhada devem ser fêmeas, a fim de reservar as crias do sexo masculino para as avaliações de retenção de mamilo, exceto se essas crias não deixarem outras fêmeas para avaliação no termo da experiência. Não devem ser eliminadas crias se a ninhada ficar com menos de 8 ou 10 crias/ninhada (em função do tamanho normal das ninhadas das estirpes de ratazanas utilizadas). Se existir apenas uma cria além do tamanho normal das ninhadas, apenas uma cria deve ser eliminada e utilizada para a colheita de sangue destinada a possíveis avaliações séricas de T4.

Observações *in vivo*

Observações clínicas

35. Ao longo de todo o período de ensaio, devem efetuar-se exames clínicos gerais, pelo menos, uma vez por dia, frequência que pode aumentar em caso de observação de sinais de toxicidade. Devem ser feitas, de preferência, à(s) mesma(s) hora(s) todos os dias e tendo em conta o período de pico dos efeitos previstos após a administração da dose. Devem registar-se modificações de comportamento significativas, sinais de parto dificil ou prolongado, bem como qualquer sinal de toxicidade, incluindo a mortalidade. Estes registos devem indicar o momento da ocorrência, o grau e a duração dos sinais de toxicidade.

Peso corporal e consumo de alimentos/água

36. Os machos e as fêmeas devem ser pesados no primeiro dia de tratamento, pelo menos uma vez por semana a partir de então e no final. Durante a gestação, as fêmeas devem ser pesadas nos dias 0, 7, 14 e 20 e nas 24 horas seguintes ao parto (dia 0 ou 1 pós-parto) e, pelo menos, nos dias 4 e 13 pós-parto. As observações devem ser registadas individualmente para cada animal adulto.

37. Durante o pré-acasalamento, a gestação e o aleitamento, o consumo de alimentos deve ser medido pelo menos uma vez por semana. A medição do consumo de alimentos durante o acasalamento é facultativa. Se o produto químico em estudo for administrado através da água para beber, o consumo de água durante estes períodos também deve ser determinado.

Ciclos éstricos

38. Os ciclos éstricos devem ser monitorizados antes do início do tratamento, de forma a selecionar para o estudo fêmeas com um ciclo regular (ver ponto 22). Os esfregaços vaginais também devem ser monitorizados diariamente desde o início do período de tratamento até haver indicações de acasalamento. Se houver preocupações quanto a efeitos agudos causados

▼M8

pelo *stress* que possam alterar os ciclos éstricos no início do tratamento, os laboratórios podem expor os animais durante 2 semanas, e em seguida colher esfregaço vaginal diariamente, a fim de monitorizar o ciclo éstrico durante, pelo menos, duas semanas no período de pré-acasalamento e igualmente durante o período de acasalamento, até que haja provas de copulação. Aquando da colheita de células vaginais/cervicais, deve ter-se o cuidado de evitar perturbar a mucosa, o que pode induzir uma pseudogravidez (7) (8).

Parâmetros relativos à descendência

39. A duração da gestação deve ser registada e calculada a partir do dia 0. Cada ninhada deve ser examinada o mais rapidamente possível após o nascimento, a fim de determinar o número e o sexo das crias, os nados-mortos, os nados-vivos e as crias que são significativamente menores do que as crias de controlo correspondentes, bem como a presença de anomalias relevantes.

40. As crias vivas devem ser contadas e determinado o sexo de cada uma; as ninhadas devem ser pesadas nas 24 horas seguintes ao parto (dia 0 ou 1 após o parto) e, pelo menos, nos dias 4 e 13 pós-parto. Para além das observações descritas no ponto 35, deve registar-se qualquer comportamento anormal das crias.

41. A DAG de cada cria deve ser medida no mesmo dia pós-natal, entre o dia 0 e o dia 4. O peso corporal da cria deve ser medido no dia em que a DAG for determinada; as DAG devem ser normalizadas de acordo com uma medida do tamanho da cria, preferencialmente a raiz cúbica do peso corporal (9). O número de mamilos/aréolas em crias do sexo masculino deve ser contado no dia 12 ou 13 após o nascimento, como recomenda a GD 151 (10) da OCDE.

Bioquímica clínica

42. As amostras de sangue são colhidas num ponto específico, de acordo com o seguinte calendário:

— pelo menos, de duas crias por ninhada, no dia 4 após o nascimento, se o número de crias o permitir (ver pontos 33 a 34)

— de todas as mães e, pelo menos, de duas crias por ninhada, no final (dia 13), e

— de todos os machos adultos, no final.

Todas as amostras de sangue são armazenadas em condições adequadas. As amostras de sangue do dia 13 das crias e dos machos adultos são analisadas para determinação dos níveis séricos de hormonas da tiroide (T4). Se necessário, procede-se a uma avaliação mais aprofundada de T4 nas amostras de sangue das mães e do dia 4 das crias. Em alternativa, podem ser medidas outras hormonas, se necessário. O sangue das crias pode ser agrupado por ninhada para a realização de análises das hormonas da tiroide. As hormonas da tiroide (T4 e TSH) devem ser, de preferência, medidas como «totais».

43. Os fatores a seguir indicados podem afetar a variabilidade dos resultados das análises hormonais e as concentrações absolutas nelas determinadas:

— momento da eutanásia, devido à variação das concentrações hormonais ao longo do dia,

— método utilizado para eutanasiar os animais sem lhes causar tensões desnecessárias, que poderiam afetar as concentrações hormonais,

— diferenças ao nível das curvas de calibração dos conjuntos para as determinações hormonais.

▼M8

44. As amostras de plasma especificamente destinadas a determinações hormonais devem colher-se à mesma hora do dia. Os conjuntos existentes no comércio para determinar concentrações hormonais podem dar valores diferentes.

Patologia

Autópsia macroscópica

45. No momento da eutanásia ou da morte durante o estudo, os animais adultos são objeto de um exame macroscópico, a fim de se detetarem quaisquer anomalias estruturais ou modificações patológicas. Deve prestar-se especial atenção aos órgãos do sistema reprodutivo. O número de locais de implantação deve ser registado. Os esfregaços vaginais devem ser examinados na manhã do dia da autópsia, para determinar a fase do ciclo éstrico e permitir a correlação com a histopatologia dos ovários.

46. Os testículos e os epidídimos, bem como a próstata e as vesículas seminais, com as glândulas coagulantes, de todos os machos adultos devem ser limpos de qualquer tecido aderente, conforme adequado, e o seu peso líquido deve ser determinado logo que possível após a dissecação, para evitar a secagem. Além disso, os pesos de órgãos facultativos podem incluir o complexo formado pelos músculos elevatórios do ânus e bulbocavernosos, as glândulas de Cowper e a glande peniana, nos machos, e os ovários (em peso húmido) e o útero (incluindo o colo do útero), nas fêmeas;

47. As crias mortas e as crias eutanasiadas até ao dia 13 após o parto ou pouco depois, devem, pelo menos, ser cuidadosamente examinadas externamente para efeitos de deteção de anomalias macroscópicas. O aparelho reprodutor externo deve ser objeto de especial atenção, devendo ser inspecionado para a deteção de sinais de alterações no desenvolvimento. No dia 13, deve conservar-se a tiroide de uma cria macho e de uma cria fêmea por ninhada.

48. Devem conservar-se os ovários, os testículos, os órgãos sexuais secundários (útero e colo do útero, epidídimos, próstata, vesículas seminais e glândulas de coagulação), a tiroide e todos os órgãos com lesões macroscópicas de todos os animais adultos. A fixação em formalina não é recomendada para o exame de rotina dos testículos e dos epidídimos. A utilização de fixador de Bouin ou de Davidatos modificado constitui um método aceitável para estes tecidos (11). Para que o fixador penetre rapidamente, deve puncionar-se superficialmente a túnica albugínea com uma agulha, com cuidado, em ambos os polos do órgão.

Histopatologia

49. Devem ser efetuados exames histológicos pormenorizados aos ovários, aos testículos e aos epidídimos (com especial ênfase nas fases da espermatogénese e na histopatologia da estrutura celular testicular intersticial) dos animais do grupo de dosagem mais elevada e do grupo de controlo. Os outros órgãos conservados, incluindo a tiroide das crias e dos animais adultos, podem ser examinados, se necessário. A pesagem da tiroide pode realizar-se após fixação. A remoção dos tecidos aderentes à tiroide deve efetuar-se com muito cuidado e também só depois da fixação, para evitar danificar tecidos, o que, a ocorrer, poderia comprometer a análise histopatológica. Os exames devem ser alargados aos animais de outros grupos de dosagens, quando forem observadas alterações no grupo de dosagem mais elevada. O documento com a referência 11, que contém orientações no domínio da histopatologia, dá mais informações sobre a dissecação, a fixação, a colheita de amostras e a histopatologia de tecidos do sistema endócrino.

▼M8

DADOS E RELATÓRIOS

Dados

50. Devem apresentar-se os dados individuais para cada animal. Além disso, todos os dados devem ser resumidos num quadro, indicando, para cada grupo de ensaio, o número de animais no início deste, o número de animais encontrados mortos durante o ensaio ou abatidos por intervenção humana, a hora da morte de cada animal, a descrição e evolução temporal dos efeitos tóxicos, o número de animais férteis, o número de fêmeas prenhes, o número de animais que apresentam sinais de toxicidade, uma descrição dos sinais de toxicidade observados, incluindo o momento em que surgiram, a duração e a gravidade dos eventuais efeitos tóxicos, os tipos de alterações histopatológicas e quaisquer dados relevantes sobre a ninhada. No apêndice 3 figura um modelo de relatório sob a forma de tabela, que se tem revelado muito útil para a avaliação de efeitos na reprodução/no desenvolvimento.

51. Devido às dimensões limitadas do estudo, as análises estatísticas, sob a forma de ensaios de «significância», têm um valor limitado para muitos parâmetros, em especial os parâmetros de reprodução. Se se utilizarem análises estatísticas, o método escolhido deve ser adequado à distribuição da variável examinada, que importa selecionar antes do início do estudo. A análise estatística da DAG e da retenção de mamilo deve basear-se em dados individuais das crias, tendo em conta os efeitos da ninhada. Se for adequado, a ninhada é escolhida como unidade de análise. A análise estatística do peso corporal das crias deve basear-se nos dados relativos a cada indivíduo, tendo em conta o tamanho da ninhada. Devido ao pequeno tamanho do grupo, a utilização de dados históricos de controlo (por exemplo, para o tamanho das ninhadas), quando disponíveis, pode também ser útil para auxiliar a interpretação do estudo.

Avaliação dos resultados

52. As conclusões do estudo de toxicidade devem ser ponderadas com base nos efeitos observados, na autópsia e nos resultados microscópicos. A análise deverá considerar a relação (ou a ausência de relação) entre a dose do produto químico em estudo e a presença ou ausência, incidência e gravidade de anomalias, incluindo lesões macroscópicas, órgãos identificados como alvos, infertilidade, alterações na reprodução e na procriação, alterações do peso corporal, efeitos na mortalidade e quaisquer outros efeitos tóxicos.

53. Devido ao período reduzido de tratamento dos machos, a histopatologia dos testículos e dos epidídimos deve ser analisada juntamente com os dados de fertilidade, aquando da avaliação dos efeitos para a reprodução masculina. A utilização de dados históricos de controlo sobre a reprodução/o desenvolvimento (por exemplo, para o tamanho da ninhada, a DAG, a retenção de mamilo, os níveis séricos de T4), quando disponíveis, pode também ser útil para auxiliar a interpretação do estudo.

54. Para fins de controlo de qualidade, propõe-se a compilação de dados de controlo históricos e o cálculo de coeficientes de variação dos dados numéricos, especialmente no caso dos parâmetros relacionados com a deteção de perturbadores do sistema endócrino. Estes dados podem ser utilizados para fins comparativos na avaliação de estudos reais.

Relatório de ensaio

55. O relatório de ensaio deve conter as seguintes informações:

Produto químico em estudo:

— origem, número de lote e data-limite de utilização, se conhecida

— estabilidade do produto químico em estudo, se conhecida.

▼**M8**

Substância monocomponente:

— aspeto físico, hidrossolubilidade e outras propriedades físico-químicas pertinentes;

— dados de identificação química, como as denominações IUPAC ou CAS, número CAS, código SMILES ou InChI, fórmula estrutural, pureza, identidade química de impurezas, caso se justifique e seja exequível, etc.

Substância multicomponentes, UVCB e misturas:

— caracterizada, na medida do possível, pela identidade química (ver acima), pela ocorrência quantitativa e pelas propriedades físico-químicas pertinentes dos componentes.

Veículo (se adequado):

— Justificação da escolha do veículo, se não for aquoso;

Animais utilizados no ensaio:

— espécie e estirpe utilizadas;

— número, idade e sexo dos animais;

— proveniência, condições de alojamento, alimentação, etc.;

— peso individual dos animais no início do ensaio

— caso não sejam utilizadas ratazanas, justificação do recurso a outra espécie.

Condições de realização do ensaio:

— fundamentação da escolha das doses;

— elementos relativos à formulação do produto químico em estudo e/ou à incorporação do mesmo na alimentação dos animais; concentração atingida, estabilidade e homogeneidade da preparação;

— elementos relativos à administração do produto químico em estudo;

— se pertinente, equivalência entre a concentração do produto químico em estudo na dieta ou na água de beber, expressa em ppm, e a dose real, expressa em mg/kg de peso corporal/dia,

— elementos relativos à qualidade dos alimentos e da água;

— descrição pormenorizada do processo de aleatorização para selecionar as crias para abate, se o abate for seletivo.

Resultados:

— pesos corporais e alterações de peso corporal;

— consumo de alimentos e consumo de água, se disponíveis;

— reações tóxicas em função do sexo e da dose administrada, nomeadamente fertilidade, gestação e outros sinais de toxicidade;

— duração do período de gestação;

— efeitos tóxicos (ou outros) na reprodução, descendência, crescimento pós-natal, etc.;

— natureza, intensidade e duração dos sinais clínicos observados (reversíveis ou irreversíveis),

— número de fêmeas adultas com ciclo éstrico normal ou anormal e duração do ciclo;

— número de nados-vivos e de perdas pós-implantação;

— dados relativos à massa corporal da cria;

— DAG de todas as crias (e peso corporal no dia da medição da DAG);

▼M8

— retenção de mamilo em crias do sexo masculino,

— níveis das hormonas da tiroide no dia 13, para as crias e os machos adultos (bem como para as mães e as crias no dia 4, caso tenham sido medidos)

— número de crias com anomalias macroscópicas visíveis, avaliação bruta dos órgãos genitais externos, número de crias significativamente menores do que as crias de controlo correspondentes;

— momento do óbito durante o estudo ou indicação de que os animais sobreviveram até ao término do estudo;

— número de implantações, dimensão da ninhada e pesos da ninhada no momento do registo;

— peso corporal no momento da eutanásia e peso dos órgãos dos animais progenitores;

— resultados das autópsias;

— descrição pormenorizada das observações histopatológicas;

— dados de absorção (se disponíveis);

— tratamento estatístico dos resultados, se for o caso.

Discussão dos resultados

Conclusões

Interpretação dos resultados

56. O estudo fornece avaliações da toxicidade para a reprodução/o desenvolvimento associada à administração de doses repetidas (ver pontos 5 e 6). Pode dar uma indicação da necessidade de realizar mais estudos e fornece orientações para a conceção dos estudos subsequentes. Deve consultar-se o documento de orientações 43 da OCDE para a interpretação dos resultados sobre a reprodução e o desenvolvimento (12). O documento de orientações 106 da OCDE sobre a avaliação histológica dos ensaios endócrinos e de reprodução em roedores (11) fornece informações sobre a preparação e a avaliação de órgãos endócrinos e de esfregaços vaginais, que podem ser úteis no contexto da presente *Test Guideline*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(1) OCDE (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. Available upon request at Organisation for Economic and Cooperation and Development, Paris.

(2) OCDE (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokyo, 27th-29th October, 1992. Disponível mediante pedido na Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Económicos, Paris.

(3) OCDE (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998. Disponível mediante pedido na Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Económicos, Paris.

(4) OCDE (2015). Feasibility Study for Minor Enhancements of TG 421/422 with ED Relevant Endpoints. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 217), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(5) OCDE (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluations. Series on Testing and Assessment, (No 19), Organisation for Economic Cooperation and Development,.Paris.

▼**M8**

(6) OCDE (2011). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment(No 150), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(7) Goldman, J.M., Murr A.S., Buckalew A.R., Ferrell J.M. and Cooper R.L. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies, Birth Defects Research, Part B, 80 (2), 84-97.

(8) Sadleir R.M.F.S (1979). Cycles and Seasons, in Auston C.R. and Short R.V. (eds.), Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization, Cambridge, New York.

(9) Gallavan R.H. Jr, Holson J.F., Stump D.G., Knapp J.F. and Reynolds V.L.(1999). Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights, Reproductive Toxicology, 13: 383-390.

(10) OCDE (2013). Guidance Document in Support of the Test Guideline on the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 151), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(11) OCDE (2009). Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No106), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(12) OCDE (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 43), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

▼**M8**

Apêndice 1

DEFINIÇÕES (VER TAMBÉM A *TEST GUIDELINE* 150 DA OCDE) (6)

Atividade anfrogénica: capacidade de um produto químico de agir como uma hormona androgénica natural (por exemplo, a testosterona), num mamífero.

Atividade antiandrogénica: capacidade de um produto químico de suprimir a ação de uma hormona androgénica natural (por exemplo, a testosterona), num mamífero.

Atividade antiestrogénica: capacidade de um produto químico de suprimir a ação de uma hormona estrogénica natural (por exemplo, o 17ß-estradiol), num mamífero.

Atividade antitiroideia: capacidade de um produto químico de suprimir a ação de uma hormona da tiroide natural (por exemplo, a $T_{3)}$, num mamífero.

Atividade estrogénica: capacidade de um produto químico de agir como hormona estrogénica natural (por exemplo o 17ß-estradiol), num mamífero.

Atividade tiroideia: capacidade de um produto químico de agir como uma hormona da tiroide natural (por exemplo a $T_{3)}$ num mamífero.

Diminuição da fertilidade: reflete perturbações de funções ou capacidades reprodutoras masculinas ou femininas.

Dosagem: termo geral que abrange a dose, a frequência desta e o tempo de aplicação da mesma.

Dose: quantidade de produto químico em estudo administrada. Exprime-se em peso diário do produto químico por unidade de peso corporal do animal em estudo (por exemplo, mg/kg de peso corporal/dia), ou sob a forma de uma concentração constante na dieta.

NOAEL: abreviatura de «*No Observed Adverse Effect Level*» («nível sem observação de efeitos nocivos»); constitui a dose máxima cuja exposição não produz efeitos nocivos observáveis.

Produto químico: uma substância ou mistura.

Produto químico em estudo: qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado o presente método de ensaio.

Toxicidade para o desenvolvimento: manifestação de toxicidade reprodutiva, sob a forma de perturbações estruturais pré-natal, peri-natal e pós-natal ou perturbações funcionais nos descendentes.

Toxicidade evidente: termo geral que descreve a existência de sinais claros de toxicidade após a administração do produto químico em estudo. Os sinais em causa devem ser suficientes para a avaliação dos perigos e devem permitir prever que o aumento da dose administrada provoque o aparecimento de sinais intensos de toxicidade e provável mortalidade.

Toxicidade materna: efeitos nocivos em fêmeas grávidas, quer ocorram especificamente (efeitos diretos) ou não especificamente (efeitos indiretos).

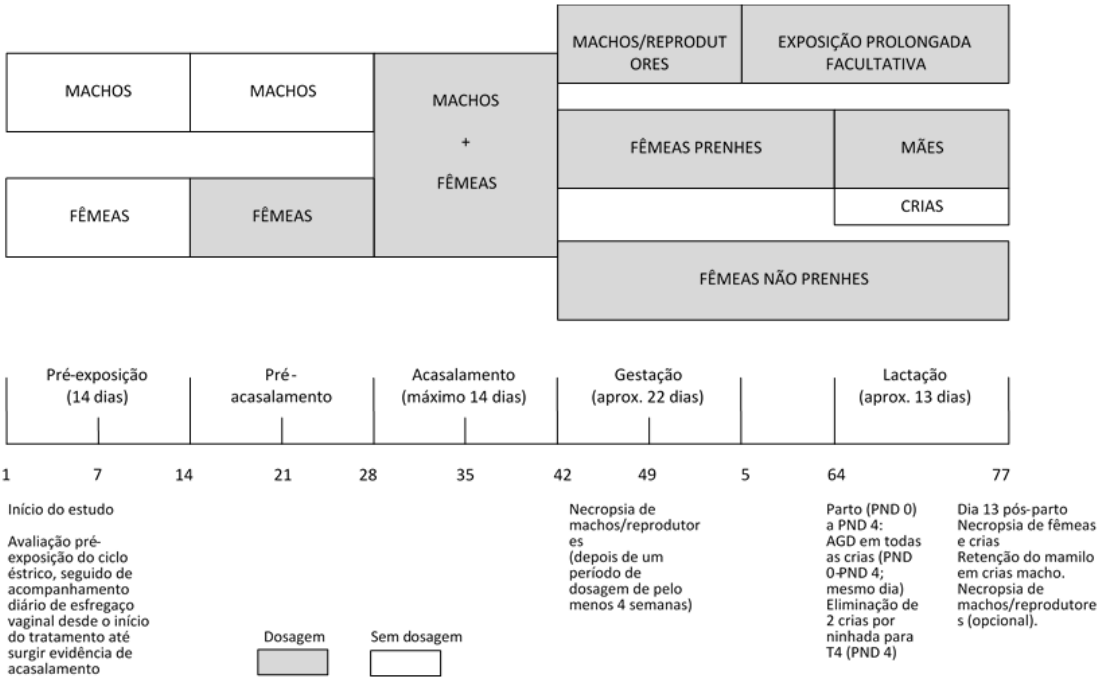
Toxicidade para a reprodução: designa efeitos prejudiciais na descendência e/ou perturbações de funções ou capacidades reprodutoras masculinas ou femininas.

Validação: processo científico concebido para caracterizar as limitações e os imperativos operacionais de um método de ensaio e demonstrar a fiabilidade e pertinência do mesmo para um determinado fim.

▼**M8**

Apêndice 2

DIAGRAMA DO CALENDÁRIO EXPERIMENTAL, COM INDICAÇÃO DA DURAÇÃO MÁXIMA DO ESTUDO – PERÍODO TOTAL DE ACASALAMENTO DE 14 DIAS



▼**M8**

Apêndice 3

RELATÓRIO DE SÍNTESE SOBRE OS EFEITOS NA REPRODUÇÃO/NO DESENVOLVIMENTO

OBSERVAÇÕES	VALORES				
Dosagem (unidades)	0 (controlo)	…	…	…	…
Pares iniciais (N)					
Ciclo éstrico (pelo menos, a duração média e a frequência de ciclos irregulares)					
Fêmeas que apresentam indícios de copulação (N)					
Fêmeas que engravidaram (N)					
Conceção nos dias 1-5 (N)					
Conceção nos dias 6 -... ([1]) (N)					
Gestação ≤ 21 dias (N)					
Gestação = 22 dias (N)					
Gestação ≥ 23 dias (N)					
Mães com nados-vivos (N)					
Mães com nados-vivos no dia 4 pp (N)					
Implantes/mãe (média)					
Crias vivas/mãe à nascença (média)					
Crias vivas/mãe no dia 4 (média)					
Rácio sexual (m/f) à nascença (média)					
Rácio sexual (m/f), no dia 4 (média)					
Peso da ninhada à nascença (média)					
Peso da ninhada no dia 4 (média)					
Peso da cria à nascença (média)					
Peso da cria no momento da medição da DAG (média dos machos, média das fêmeas).					

▼M8

OBSERVAÇÕES	VALORES				
Dosagem (unidades)	0 (controlo)	…	…	…	…
DAG da cria no mesmo dia, dia 4 após o nascimento (média dos machos, média das fêmeas, nota PND)					
Peso das crias no dia 4 (média)					
Retenção de mamilo das crias do sexo masculino no dia 13 (média)					
Peso das crias no dia 13 (média)					
CRIAS ANORMAIS					
Mães com 0					
Mães com 1					
Mães com ≥ 2					
PERDA DE CRIAS					
Implantações pré-natais/pós-natais (implantações menos nados-vivos)					
Fêmeas com 0					
Fêmeas com 1					
Fêmeas com 2					
Fêmeas com ≥ 3					
Pós-natal (nados-vivos menos vivos no dia 13 pós-natal)					
Fêmeas com 0					
Fêmeas com 1					
Fêmeas com 2					
Fêmeas com ≥ 3					

([1]) Último dia do período de acasalamento

▼M8

B.64. ESTUDO DA TOXICIDADE DE DOSE REPETIDA COMBINADO COM O ENSAIO DE RASTREIO DA TOXICIDADE PARA A REPRODUÇÃO/O DESENVOLVIMENTO

INTRODUÇÃO

1. O presente método de ensaio é equivalente à *Test Guideline* 422 (2016) da OCDE. As diretrizes da OCDE para o ensaio de produtos químicos são revistas periodicamente à luz do progresso científico. A diretriz original para o ensaio, n.º 422, foi adotada em 1996, com base num protocolo denominado *Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Screening Test*, debatido em duas reuniões de peritos, realizadas em Londres, em 1990 (1), e em Tóquio, em 1992 (2).

2. O presente método combina uma parte de verificação da toxicidade para a reprodução/o desenvolvimento que se baseia na experiência adquirida nos Estados-Membros com a utilização do método original para os produtos químicos existentes com elevado volume de produção e com ensaios exploratórios com substâncias de controlo positivo (3) (4), com uma parte relativa à toxicidade de dose repetida, em conformidade com a *Test Guideline* 407 da OCDE (*Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents*, correspondente ao capítulo B.7 deste anexo).

3. O presente método de ensaio foi atualizado com parâmetros relativos a perturbadores do sistema endócrino, na sequência da atividade altamente prioritária da OCDE, iniciada em 1998, de revisão das diretrizes de ensaio existentes e elaboração de novas orientações para a análise e o ensaio de potenciais perturbadores do sistema endócrino (5). Neste contexto, a *Test Guideline* 407 (correspondente ao capítulo B.7 deste anexo) foi melhorada em 2008 com parâmetros adequados para detetar a atividade endócrina de produtos químicos em estudo. O objetivo da atualização da *Test Guideline* 422 era incluir alguns parâmetros relevantes no rastreio dos perturbadores do sistema endócrino nas *Test Guidelines* cujos períodos de exposição abrangem alguns dos períodos sensíveis do desenvolvimento (período pré-natal e primeira fase do período pós-natal).

4. A *Test Guideline* 443 (estudo alargado de toxicidade reprodutiva uma geração, correspondente ao capítulo B.56 deste anexo) foi incluída na *Test Guideline* 422 com base num estudo de viabilidade relativo a questões científicas e técnicas relacionadas com a inclusão, bem como eventuais adaptações da conceção do ensaio necessárias para a mesma (6).

5. O presente método de ensaio destina-se a produzir informações limitadas sobre os efeitos de um produto químico em estudo no desempenho reprodutor masculino e feminino, como a função gonadal, o comportamento de acasalamento, a fecundação e o desenvolvimento do feto e o parto. Não constitui uma alternativa aos métodos de ensaio B.31, B.34, B.35 ou B.56, nem os substitui.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

6. Na apreciação e avaliação das características de toxicidade de produtos químicos em estudo pode determinar-se a toxicidade oral por dose repetida depois de se obterem informações sobre a toxicidade aguda a partir de ensaios realizados para o efeito. O presente estudo fornece informações sobre os possíveis riscos para a saúde de uma exposição repetida num período relativamente limitado. O método compreende um estudo básico de toxicidade por dose repetida, que pode utilizar-se para produtos químicos que não justifiquem um estudo a 90 dias (por exemplo, se o volume de produção não exceder determinados limites) ou como estudo exploratório com vista a um estudo a longo prazo. Na realização do estudo, devem seguir-se os princípios de orientação e as considerações descritas no documento de orientações n.º 19 da OCDE quanto ao reconhecimento, avaliação e utilização dos sinais clínicos como parâmetros de tratamento humano para experiências com animais utilizados em avaliações de segurança (7).

▼**M8**

7. O estudo inclui ainda um ensaio de despistagem da toxicidade para a reprodução/o desenvolvimento; por conseguinte, pode também ser utilizado para fornecer informações preliminares sobre possíveis efeitos no desempenho reprodutor dos machos e das fêmeas, como a função gonadal, o comportamento de acasalamento, a fecundação e o desenvolvimento do feto e o parto, quer numa fase inicial de avaliação das propriedades toxicológicas dos produtos químicos em estudo, quer no ensaio de produtos químicos que suscitam preocupação. O método de ensaio não fornece informações completas sobre todos os aspetos da reprodução e do desenvolvimento. Proporciona apenas, nomeadamente, meios limitados para a deteção de manifestações pós-natais de exposição pré-natal ou de efeitos que possam ser induzidos durante a exposição pós-natal. Devido, entre outros motivos, ao número relativamente reduzido de animais dos grupos de dosagem, à seletividade dos parâmetros e à curta duração do estudo, o método não fornece dados que apoiem a declaração definitiva de inexistência de efeitos na reprodução/no desenvolvimento. Além disso, na ausência de dados de outros ensaios de toxicidade para a reprodução/o desenvolvimento, os resultados positivos são úteis para a avaliação preliminar dos perigos e contribuem para fundamentar as decisões quanto à necessidade e à oportunidade de realizar ensaios adicionais.

8. Os resultados correspondentes aos parâmetros relacionados com o sistema endócrino devem interpretar-se com base no documento *Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals* (8), elaborado pela OCDE, que estabelece um quadro concetual para o ensaio e a avaliação de produtos químicos perturbadores do sistema endócrino. Nesse quadro, o método correspondente à *Test Guideline* 422 da OCDE melhorada consta do nível 4, constituindo um ensaio *in vivo* que fornece dados sobre efeitos nocivos em determinados parâmetros do sistema endócrino. Contudo, um sinal do sistema endócrino não pode, por si só, ser considerado prova suficiente de que o produto químico em estudo é um perturbador desse sistema.

9. O método confere especial importância aos efeitos neurológicos, devendo efetuar-se um exame clínico pormenorizado dos animais, de modo a obter o máximo possível de informações. Deve permitir identificar substâncias com potencial neurotóxico passíveis de necessitarem de uma investigação mais aprofundada. Além disso, pode também fornecer uma indicação básica dos efeitos imunológicos.

10. Na ausência de dados de outros estudos de toxicidade sistémica, de toxicidade para a reprodução/o desenvolvimento, de neurotoxicidade e/ou de imunotoxicidade, os resultados positivos são úteis para a avaliação preliminar dos perigos e contribuem para fundamentar as decisões relativas à necessidade e à oportunidade de ensaios adicionais. O ensaio pode ser particularmente útil no âmbito do *Screening Information Data Set* (conjunto de dados de informação de despistagem) da OCDE para a avaliação dos produtos químicos existentes relativamente aos quais existe pouca ou nenhuma informação toxicológica, podendo também servir de alternativa à realização de dois ensaios separados de toxicidade de dose repetida (*Test Guideline* 407 da OCDE, que corresponde ao capítulo B.7 deste anexo) e de toxicidade para a reprodução/o desenvolvimento (*Test Guideline* 421 da OCDE, que corresponde ao capítulo B.63 deste anexo), respetivamente. Pode também ser utilizado como estudo exploratório de determinação da gama de dosagens para estudos mais exaustivos sobre a reprodução/o desenvolvimento, ou sempre que isso for considerado relevante.

11. Em geral, parte-se do princípio de que existem diferenças de sensibilidade entre os animais prenhes e não prenhes. Por isso, pode ser mais complexo determinar no ensaio combinado dosagens adequadas para avaliar tanto a toxicidade sistémica generalizada como a toxicidade específica para a reprodução/o desenvolvimento do que em ensaios realizados separadamente. Além disso, a interpretação dos resultados dos ensaios, no que respeita à toxicidade sistémica geral, pode ser mais difícil do que quando é realizado um estudo separado de doses repetidas, sobretudo se os parâmetros séricos e histopatológicos não forem avaliados em simultâneo no estudo. Devido a estas

▼M8

complexidades técnicas, é necessária uma experiência considerável em ensaios de toxicidade para realizar o ensaio combinado. Por outro lado, além do recurso a um número inferior de animais, o ensaio combinado pode constituir um meio mais adequado para distinguir os efeitos diretos na reprodução/no desenvolvimento dos efeitos secundários em relação a outros efeitos (sistémicos).

12. No presente ensaio, o período de dosagem é mais longo do que num estudo convencional de dose repetida com 28 dias. No entanto, utiliza menos animais de cada sexo por grupo do que os estudos convencionais de dose repetida a 28 dias realizados em complemento a ensaios da toxicidade na reprodução/no desenvolvimento.

13. O presente método prevê a administração por via oral do produto químico em estudo. Pode ser necessário introduzir alterações se forem utilizadas outras vias de exposição.

14. Antes da aplicação do método de ensaio a uma mistura para obter dados com fins normativos, importa ponderar se – e, em caso afirmativo, por que motivo – o método pode proporcionar resultados adequados para o efeito. Essas considerações não são necessárias se existir um requisito normativo para o ensaio da mistura.

15. Definem-se no apêndice 1 alguns conceitos utilizados.

PRINCÍPIO DO ENSAIO

16. O produto químico em estudo é administrado, em doses escalonadas, a vários grupos de machos e fêmeas. Os machos devem ser tratados durante, pelo menos, quatro semanas, até ao dia anterior ao da eutanásia, inclusive, o que abrange, no mínimo, duas semanas antes do acasalamento, o período de acasalamento e aproximadamente duas semanas após o acasalamento. Tendo em conta o período limitado de dosagem pré-acasalamento dos machos, a fertilidade pode não constituir um indicador particularmente sensível da toxicidade testicular. Por conseguinte, é essencial um exame histológico pormenorizado dos testículos. A combinação de um período de dosagem pré-acasalamento de duas semanas e de observações subsequentes de acasalamento/fertilidade com um período global de dosagem de, pelo menos, quatro semanas, seguido de histopatologia pormenorizada das gónadas do macho, é considerada suficiente para permitir a deteção da maioria dos efeitos na fertilidade masculina e na espermatogénese.

17. As fêmeas devem ser tratadas ao longo de todo o estudo, ou seja, duas semanas antes do acasalamento – com o objetivo de abranger, pelo menos, dois ciclos éstricos completos –, o período variável até à conceção, a gravidez e, pelo menos, treze dias após o parto, até ao dia anterior ao da eutanásia, inclusive.

18. A duração do estudo, após a aclimatização, com uma avaliação do ciclo éstrico efetuada antes do início do tratamento, depende do desempenho das fêmeas, e é de cerca de 63 dias, [pelo menos 14 dias antes do acasalamento, até 14 dias de acasalamento, 22 dias de gestação, 13 dias de aleitamento].

19. No decurso do período de administração, verifica-se atentamente, todos os dias, se os animais evidenciam sinais de toxicidade. Os que morrem ou são eutanasiados no período de ensaio são autopsiados; no final do ensaio, são eutanasiados e autopsiados os animais sobreviventes.

▼M8

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Seleção de espécies animais

20. O presente método de ensaio foi concebido para ratazanas. Se os parâmetros que nele se especificam forem estudados noutra espécie de roedor, essa opção deve ser justificada pormenorizadamente. A ratazana foi a única espécie utilizada no programa internacional de validação da deteção de perturbadores do sistema endócrino (TG 407). Deve evitar-se a utilização de estirpes de fecundidade baixa ou nas quais se verifique uma incidência elevada de deficiências de desenvolvimento. Devem utilizar-se animais virgens saudáveis, não sujeitos a experiências anteriores. Importa especificar a espécie, a estirpe, o sexo, o peso e/ou a idade dos animais utilizados. No início do estudo, as diferenças de peso entre os animais devem ser mínimas, não se desviando mais de 20 % do peso médio dos animais de cada sexo. Nos casos em que for realizado como estudo preliminar de um estudo a longo prazo ou numa geração, é preferível utilizar animais da mesma estirpe e proveniência em ambos os estudos.

Condições de alojamento e de alimentação

21. Todos os procedimentos devem respeitar as normas locais de manipulação de animais de laboratório. A temperatura do biotério deve ser de 22 °C ± 3 °C. A humidade relativa deve ser, no mínimo, de 30 % e, de preferência, não deve exceder 70 %, exceto durante a limpeza do biotério. A iluminação deve ser artificial, com uma sequência de 12 horas de luz seguidas de 12 horas de escuridão. Para a alimentação, podem ser usadas dietas convencionais de laboratório, com acesso ilimitado a água potável. A escolha da dieta pode ser influenciada pela necessidade de garantir uma mistura adequada do produto químico em estudo, quando administrado por essa via.

22. Os animais devem ser alojados em pequenos grupos do mesmo sexo. Os animais podem ser alojados individualmente, se tal se justificar do ponto de vista científico. Em caso de alojamento coletivo, cada gaiola não deve alojar mais de cinco animais. O acasalamento deve ocorrer em gaiolas adequadas para o efeito. As fêmeas prenhes devem ser colocadas em gaiolas individuais e dispor de materiais de nidificação. As fêmeas em lactação devem ser colocadas em gaiolas individuais com as crias.

23. Deve efetuar-se com regularidade uma pesquisa de contaminantes nos alimentos fornecidos e conservar-se uma amostra da dieta até o relatório estar concluído.

Preparação dos animais

24. Os animais adultos jovens e saudáveis são repartidos ao acaso pelos grupos de tratamento e por gaiolas. As gaiolas devem estar dispostas de forma a minimizar possíveis efeitos decorrentes do seu posicionamento. Os animais são identificados de forma inequívoca, devendo ser aclimatados às condições de laboratório durante, pelo menos, cinco dias antes de se iniciar o estudo.

Preparação das doses

25. Recomenda-se a consulta do PON aquando da implementação e utilização de um desses modelos no laboratório. Se for selecionada a via oral, o produto químico em estudo é geralmente administrado por gavagem; no entanto, os produtos podem ser administrados através dos alimentos ou da água de beber.

26. Se necessário, o produto químico em estudo pode ser dissolvido ou suspenso num veículo adequado. Recomenda-se que, sempre que possível, se opte por uma solução ou suspensão aquosa; caso isso não seja viável, pode optar-se por uma solução ou suspensão num óleo (por exemplo, em óleo de milho); em último caso, pode recorrer-se a uma solução noutro veículo. Se este não for aquoso, devem conhecer-se as suas características de toxicidade. Importa determinar a estabilidade e a homogeneidade do produto químico em estudo no veículo.

▼M8

PROCEDIMENTO

Número e sexo dos animais

27. Recomenda-se que cada grupo seja iniciado com, pelo menos, 10 machos e 12-13 fêmeas. As fêmeas serão avaliadas para pré-exposição do ciclo éstrico; os animais que não apresentem ciclos típicos de 4-5 dias não são incluídos no estudo. Assim, é recomendável utilizar um número mais elevado de fêmeas, a fim de assegurar a presença de 10 fêmeas reprodutoras por grupo. Exceto no caso de efeitos tóxicos marcados, prevê-se que o número de fêmeas prenhes por grupo seja, no mínimo, igual a 8, que, normalmente, é o número mínimo aceitável de fêmeas prenhes por grupo. O objetivo é produzir gravidezes e crias em número suficiente para assegurar uma avaliação significativa do potencial do produto químico em estudo para afetar a fertilidade, a gravidez, o comportamento materno e de aleitamento, o crescimento e o desenvolvimento da geração F_1, desde a fecundação até ao dia 13 pós-parto. Caso se preveja a eutanásia de alguns animais durante o ensaio, o referido número deve ser acrescido do número de animais a sacrificar. Deve ponderar-se a possibilidade de constituir um grupo-satélite adicional de cinco animais de cada sexo nos grupos de controlo e de dose máxima, para observar a reversibilidade, a persistência ou a ocorrência tardia de efeitos tóxicos sistémicos, durante, pelo menos, 14 dias após o tratamento. Os animais dos grupos-satélite não devem acasalar, pelo que não são utilizados na avaliação da toxicidade para a reprodução/o desenvolvimento.

Dosagem

28. De modo geral, devem utilizar-se, no mínimo, três lotes de ensaio e um lote de controlo. Se não se dispuser de dados gerais de toxicidade adequados, pode efetuar-se um estudo exploratório, com animais da mesma estirpe e proveniência, para facilitar a determinação das doses a utilizar. Salvo no que respeita à exposição ao produto químico em estudo, os animais dos grupos de controlo devem ser tratados do mesmo modo que os animais dos grupos de ensaio. Se for utilizado um veículo para administrar o produto químico em estudo, o grupo de controlo deve receber o volume máximo de veículo utilizado.

29. Na seleção das doses devem ter-se em conta os dados eventualmente disponíveis em matéria de toxicidade e toxicocinética. Importa também ter em conta o facto de poder haver diferenças de sensibilidade entre animais prenhes e não prenhes. Deve escolher-se como dose mais elevada uma dose que induza efeitos tóxicos, mas não cause mortalidade nem sofrimento evidente. Posteriormente, deve selecionar-se uma sequência decrescente de doses, com o objetivo de evidenciar uma correlação entre a dose administrada e a reação, bem como a ausência de efeitos nocivos associados à administração da dose mais reduzida. O intervalo ótimo entre doses consecutivas é frequentemente definido por um fator de 2 a 4. A inclusão de um quarto grupo de ensaio é muitas vezes preferível ao uso de intervalos muito grandes entre as dosagens (fatores superiores a 10).

30. Caso se observem sinais de toxicidade generalizada (por exemplo, redução do peso corporal, efeitos ao nível hepático, cardíaco, pulmonar ou renal, etc.) ou outras alterações que possam não ser reações tóxicas (por exemplo, diminuição da quantidade de alimentos ingerida, dilatação hepática, etc.), deverá interpretar-se com cautela qualquer efeito observado ao nível dos parâmetros endócrinos.

Ensaio no limite

31. Sempre que um ensaio, realizado de acordo com o presente método, que utilize uma dose de, pelo menos, 1 000 mg/kg de massa corporal/dia ou – no caso da administração através dos alimentos ou da água para beber – uma percentagem equivalente em relação aos mesmos (com base na determinação da massa corporal), não produza efeitos tóxicos observáveis, ou se, tendo em conta dados referentes a substâncias estruturalmente afins, não se prever a ocorrência de efeitos tóxicos, pode não ser necessário efetuar um estudo

▼M8

completo com várias doses. Nesses casos, justifica-se a realização de um ensaio no limite, exceto se os dados relativos à exposição humana aconselharem o ensaio de doses superiores. Caso se usem outras formas de administração, como a inalação ou a aplicação cutânea, as propriedades físico-químicas do produtos químico de ensaio são muitas vezes indicativas e limitativas do nível máximo de exposição praticável.

Administração das doses

32. Os animais são tratados diariamente com o produto químico em estudo, durante uma semana. A administração forçada por meio de uma sonda esofágica deve efetuar-se numa dose única, utilizando um tubo estomacal ou uma cânula de intubação adequada. O volume máximo de líquido que pode ser administrado de cada vez depende do tamanho do animal. O volume máximo de líquido que pode ser administrado numa toma depende também do tamanho do animal de ensaio, não devendo exceder 1 ml/100 g de peso corporal; excetuam-se as soluções aquosas, que podem ser administradas na proporção de 2 ml/100 g de peso corporal. Exceto no caso de produtos químicos irritantes ou corrosivos, que normalmente revelam efeitos exacerbados em concentrações superiores, a variabilidade no volume de ensaio deve ser minimizada ajustando a concentração de modo a garantir um volume constante em todos os níveis de dosagem.

33. No caso de produtos administrados através da alimentação ou da água de beber, é importante assegurar que as quantidades do produto não interferem com a nutrição normal ou com a composição da água. Se o produto for administrado na alimentação, pode optar-se por concentrações constantes desta (da ordem das ppm) ou por doses constantes em relação ao peso corporal de cada animal. Se o produto químico em estudo for administrado por gavagem, a dose deve ser administrada todos os dias à mesma hora, devendo ajustar-se, pelo menos, uma vez por semana a fim de se manter uma dose constante em relação ao peso corporal do animal; caso o estudo combinado de toxicidade oral da dose repetida preceda um estudo a longo prazo, é conveniente utilizar uma dieta semelhante em ambos os ensaios.

Calendário da experiência

34. O tratamento de ambos os sexos deve ter início 2 semanas antes do acasalamento, depois de os animais serem aclimatados durante, pelo menos, 5 dias e as fêmeas serem sujeitas a exames de deteção de ciclos éstricos normais (num período de 2 semanas anterior ao tratamento). O estudo deve ser programado de forma a que a avaliação do ciclo éstrico comece pouco depois de os animais terem atingido a plena maturidade sexual, o que pode variar ligeiramente nas diferentes linhagens de ratazanas em laboratórios diferentes, sendo, por exemplo, às 10 semanas nas ratazanas Sprague Dawley e cerca das 12 semanas nas ratazanas Wistar. As mães com crias devem ser eutanasiadas no dia 13 após o parto, ou pouco depois. Para permitir que os animais jejuem desde a véspera da colheita de sangue (caso seja preferível esta opção), as mães e as crias não têm necessariamente de ser abatidas no mesmo dia. O dia de nascimento (ou seja, quando o parto é concluído) é definido como o dia 0 após o parto. As fêmeas que não apresentem qualquer indício de copulação são mortas 24 a 26 dias após o último dia do período de acasalamento. O nível de dosagem é mantido em ambos os sexos durante o período de acasalamento. Os machos devem continuar a ser tratados após o período de acasalamento, pelo menos até ter decorrido o período total mínimo de dosagem, de 28 dias. Em seguida, são eutanasiados ou, em alternativa, são mantidos e continuam a ser tratados, para um eventual segundo acasalamento, se isso for considerado adequado.

35. As fêmeas prenhes devem continuar a ser tratadas durante a gravidez e, pelo menos, até ao dia 13 após o parto ou ao dia anterior ao abate. No caso de o produto químico em estudo ser administrado por inalação ou por via cutânea, o tratamento deve continuar a ser administrado pelo menos até ao dia 19 de gestação, inclusive, e ser retomado o mais rapidamente possível, o mais tardar no dia 4 após o parto.

▼M8

36. Os animais de grupos-satélite com observações subsequentes, caso sejam utilizados, não acasalam. Devem ser mantidos durante, pelo menos, 14 dias após o primeiro abate programado de mães, sem tratamento que permita detetar a ocorrência tardia, a persistência ou a superação dos efeitos tóxicos.

37. O apêndice 2 apresenta um diagrama do calendário da experiência.

Ciclos éstricos

38. Os ciclos éstricos devem ser monitorizados antes do início do tratamento, de forma a selecionar para o estudo fêmeas com um ciclo regular (ver ponto 27). Os esfregaços vaginais também devem ser monitorizados diariamente desde o início do período de tratamento, até haver indicações de acasalamento. Se houver preocupações quanto a efeitos agudos ligados ao *stress* que possam alterar os ciclos éstricos com o início do tratamento, os laboratórios podem expor os animais durante 2 semanas, e em seguida colher esfregaços vaginal diariamente, a fim de monitorizar o ciclo éstrico durante, pelo menos, duas semanas durante o período de pré-acasalamento e igualmente durante o período de acasalamento, até que haja provas de copulação. Aquando da colheita de células vaginais/cervicais, deve ter-se o cuidado de evitar perturbar a mucosa, o que pode induzir uma pseudogravidez (8) (9).

Processo de acasalamento

39. Normalmente, devem ser utilizados neste estudo acasalamentos de 1:1 (um macho e uma fêmea). Pode haver exceções em caso de morte ocasional de machos. A fêmea deve ser colocada com o mesmo macho até se observarem indícios de copulação ou terem decorrido duas semanas. Devem examinar-se as fêmeas todas as manhãs, para verificar a presença de esperma ou de rolhão vaginal. O dia 0 da gravidez é definido como o dia em que é confirmada a evidência de acasalamento (deteção de rolhão vaginal ou esperma). Se a tentativa de acasalamento for mal sucedida, poderá tentar-se um novo acasalamento das fêmeas com machos do mesmo grupo comprovadamente aptos a procriar.

Número de animais por ninhada

40. No dia 4 após o parto, o número de animais de cada ninhada pode ser ajustado, eliminando as crias excessivas por seleção aleatória, a fim de se obter, tão perto quanto possível, quatro ou cinco crias por sexo e por ninhada, consoante o tamanho normal das ninhadas das estirpes de ratazanas utilizadas. Devem ser colhidas amostras de sangue de duas das crias excedentárias, que serão agrupadas e utilizadas para a determinação dos níveis do soro T4. Não é adequada a eliminação seletiva das crias, por exemplo, com base no peso corporal ou na distância anogenital (DAG). Sempre que o número de crias do sexo masculino ou feminino impeça a obtenção de quatro ou cinco animais de cada sexo por ninhada, é admissível um ajustamento parcial – por exemplo, seis machos e quatro fêmeas. Não devem ser eliminadas crias se as ninhadas ficarem aquém da meta de abate (8 ou 10 crias/ /ninhada). Se existir uma única cria além da meta de abate, apenas uma cria deve ser eliminada e utilizada para a colheita de sangue com vista a possíveis avaliações séricas de T4.

41. Se o tamanho da ninhada não for ajustado, eutanasiam-se duas crias por ninhada no dia 4 após o nascimento e colhem-se amostras de sangue para medição das concentrações de hormonas da tiroide. Se possível, essas duas crias de cada ninhada devem ser fêmeas, a fim de reservar as crias do sexo masculino para as avaliações de retenção de mamilo, exceto se essas crias não deixarem outras fêmeas para avaliação no termo da experiência. Não devem ser eliminadas crias se a ninhada ficar com menos de 8 ou 10 crias (em função do tamanho normal das ninhadas das estirpes de ratazanas em causa). Se existir uma única cria além do tamanho normal das ninhadas, apenas uma cria deve ser eliminada e utilizada para a colheita de sangue destinada a possíveis avaliações séricas de T4.

▼M8

Observações

42. Devem ser feitas observações clínicas gerais pelo menos uma vez por dia, de preferência à(s) mesma(s) hora(s), tendo em conta o período de pico de efeitos antecipados após a administração da dose. Deve registar-se o estado de saúde dos animais. Pelo menos, duas vezes por dia verificam-se os casos de morbidez ou mortalidade no conjunto dos animais.

43. Deve efetuar-se um exame clínico aprofundado de cada animal progenitor antes da primeira exposição (para permitir comparações subsequentes com o estado inicial do animal) e, posteriormente, pelo menos uma vez por semana. O exame deve decorrer no exterior da gaiola, num recinto adequado e, de preferência, todos os dias à mesma hora. As observações devem ser cuidadosamente registadas, de preferência por recurso a um sistema definido em pormenor pelo laboratório em causa. Deve zelar-se por que as condições de ensaio sejam o mais constantes possível; os exames devem ser efetuados, de preferência, por pessoal que não esteja a par do ensaio realizado. Entre os sinais a registar contam-se alterações da pele, da pelagem, dos olhos e das mucosas e a ocorrência de secreções, excreções ou reações neurovegetativas (por exemplo lacrimação, horripilação, alterações da dimensão pupilar ou respiração anormal). Deve também registar-se qualquer alteração da forma de o animal se mover, da postura e da reação à manipulação, bem como a ocorrência de movimentos clónicos ou tónicos e de comportamentos estereotipados (por exemplo, atos de higiene repetitivos ou movimentação repetitiva em círculo), partos difíceis ou prolongados ou comportamentos estranhos (automutilação, locomoção para trás, etc.) (10).

44. Num dado momento do estudo, deve proceder-se à avaliação da reação sensorial a diferentes estímulos (por exemplo, estímulos auditivos, visuais e propriocetivos) (8) (9) (11), da força de preensão (12) e da atividade motora (13), em cinco machos e cinco fêmeas, selecionados aleatoriamente de cada grupo. As referências bibliográficas contêm mais informações sobre a forma de proceder em cada caso, embora possam adotar-se procedimentos distintos dos nelas descritos. Nos machos, as observações funcionais devem ser feitas perto do final do período de dosagem, pouco antes do abate programado, mas antes da colheita de amostras de sangue para hematologia ou química clínica (ver pontos 53-56, incluindo a nota de rodapé 1). As fêmeas devem encontrar-se num estado fisiológico semelhante durante estes ensaios funcionais e devem, de preferência, ser testadas uma vez durante a última semana de aleitamento (por exemplo, dias de aleitamento 6-13), pouco antes do seu abate programado. Na medida do possível, deve minimizar-se o tempo de separação das mães e das crias.

45. As observações funcionais efetuadas perto do final do estudo podem ser omitidas se o mesmo for realizado a título de estudo preliminar a um estudo posterior de toxicidade subcrónica (90 dias) ou a um estudo de longo prazo. Nesse caso, os exames funcionais devem realizar-se no estudo subsequente. Não obstante, os dados das observações funcionais efetuadas durante o estudo de dose repetida podem facilitar a escolha do nível de doses a utilizar no estudo de toxicidade subcrónica ou do estudo de longo prazo posterior.

46. A título excecional, podem também omitir-se as observações funcionais no caso dos grupos de animais que apresentem sinais de toxicidade cuja intensidade interferiria de modo significativo com o desempenho do ensaio.

47. A duração da gestação deve ser registada e calculada a partir do dia 0. Deve examinar-se cada ninhada o mais rapidamente possível após o parto, a fim de determinar o número e o sexo das crias, os nados-mortos, os nados-vivos, as crias que são significativamente inferiores às crias de controlo correspondentes e a presença de anomalias macroscópicas.

▼M8

48. As crias vivas devem ser contadas e determinado o sexo de cada uma; as ninhadas devem ser pesadas nas 24 horas seguintes ao parto (dia 0 ou 1 após o parto) e, pelo menos, nos dias 4 e dia 13 pós-parto. Além das observações sobre os animais progenitores (ver pontos 43 e 44), deve registar-se qualquer comportamento anormal das crias.

49. A DAG de cada cria deve ser medida no mesmo dia pós-natal, entre o dia 0 e o dia 4. O peso corporal da cria deve ser medido no dia em que a DAG for medida e as DAG devem ser normalizadas de acordo com uma medida do tamanho da cria, preferencialmente a raiz cúbica do peso corporal (14). O número de mamilos/auréolas em crias do sexo masculino deve ser contado no dia 12 ou 13 após o nascimento, tal como recomendado na GD 151 (15) da OCDE.

Peso corporal e consumo de alimentos/água

50. Os machos e as fêmeas devem ser pesados no primeiro dia de tratamento, pelo menos uma vez por semana a partir de então e no final. Durante a gestação, as fêmeas devem ser pesadas nos dias 0, 7, 14 e 20 e nas 24 horas seguintes ao parto (dia 0 ou 1 pós-parto) e, pelo menos, nos dias 4 e 13 pós--parto. As observações devem ser registadas individualmente para cada animal adulto.

51. Durante o pré-acasalamento, a gestação e o aleitamento, o consumo de alimentos deve ser medido pelo menos uma vez por semana. A medição do consumo de alimentos durante o acasalamento é facultativa. Se o produto químico em estudo for administrado através da água de beber, o consumo de água deve também ser medido nestes períodos.

Hematologia

52. Durante o ensaio, devem determinar-se os seguintes parâmetros hematológicos de cinco machos e cinco fêmeas escolhidos aleatoriamente de cada grupo: hematócrito, concentração de hemoglobina, contagem de eritrócitos, reticulócitos, contagem total de leucócitos e fórmula leucocitária, contagem de plaquetas e tempo e potencial de coagulação. Caso o produto químico em estudo ou os seus metabolitos potenciais tenham, ou se suspeite que tenham, propriedades oxidantes, devem efetuar-se outras análises, como a determinação da concentração de meta-hemoglobina e de corpos de Heinz.

53. As amostras de sangue devem ser colhidas num determinado ponto. As fêmeas devem estar em condições fisiológicas semelhantes durante a colheita das amostras. A fim de evitar dificuldades práticas relacionadas com a variabilidade do início da gestação, a colheita de sangue das fêmeas pode ser feita no final do período de pré-acasalamento, e não imediatamente antes ou no âmbito do processo de eutanásia. De preferência, as amostras de sangue dos machos devem ser colhidas imediatamente antes ou como parte integrante do processo de eutanásia. Em alternativa, a colheita de sangue nos machos pode também ser feita no final do período de pré-acasalamento, se se optar por este momento para as fêmeas.

54. As amostras de sangue devem ser armazenadas em condições adequadas.

Bioquímica clínica

55. Devem efetuar-se determinações bioquímicas destinadas a investigar os principais efeitos tóxicos sobre os tecidos, nomeadamente renal e hepático, com

▼M8

amostras de sangue dos cinco machos e cinco fêmeas escolhidos aleatoriamente em todos os grupos. Recomenda-se que os animais sejam jejuados desde a véspera da colheita de sangue ([1]). Os parâmetros a determinar no plasma ou no soro são os seguintes: sódio, potássio, glucose, colesterol total, ureia, creatinina, proteínas totais e albumina, além de, pelo menos, duas enzimas indicadoras dos efeitos hepatocelulares (como a alanina-aminotransferase, a aspartato-aminotransferase e o sorbitol-desidrogenase). Em certos casos, a determinação de outras enzimas (de origem hepática ou outra origem) e da bilirrubina pode fornecer informações úteis.

56. Em cada local, as amostras de sangue são colhidas com base no seguinte calendário:

— pelo menos, de duas crias por ninhada no dia 4 após o nascimento, se o número de crias o permitir (ver pontos 40 e 41)

— de todas as mães e, pelo menos, duas crias por ninhada, no final (dia 13), e

— de todos os machos adultos, no final.

Todas as amostras de sangue são armazenadas em condições adequadas. As amostras de sangue do dia 13 das crias e dos machos adultos são analisadas para a determinação dos níveis séricos de hormonas da tiroide (T4). Se necessário, procede-se a uma avaliação mais aprofundada de T4 nas amostras de sangue das mães e do dia 4 das crias. Em alternativa, podem ser medidas outras hormonas, se necessário. O sangue das crias pode ser agrupado por ninhada para a realização de análises das hormonas da tiroide. As hormonas da tiroide (T4 e TSH) devem ser, de preferência, medidas como «totais».

57. Como opção, podem realizar-se na última semana do ensaio as seguintes análises de urina em cinco machos de cada grupo escolhidos aleatoriamente na última semana do estudo, recolhida de acordo com um programa previamente estabelecido: aparência, volume, osmolalidade ou gravidade específica, pH, proteínas, glucose e sangue/hematócitos.

58. Além disso, deve prever-se a pesquisa de marcadores séricos que forneçam indicações gerais sobre a lesão de tecidos. Caso as propriedades conhecidas do produto químico em estudo afetem, ou se preveja que possam afetar, o perfil metabólico da mesma, devem realizar-se outras determinações, nomeadamente de cálcio, fosfatos, triglicéridos em jejum e glucose em jejum, hormonas específicas, meta-hemoglobina e colinesterase. Estas determinações devem ser identificadas caso a caso.

59. Os fatores a seguir indicados podem afetar a variabilidade dos resultados das análises hormonais e as concentrações absolutas nelas determinadas:

— momento da eutanásia, devido à variação das concentrações hormonais ao longo do dia,

([1]) No caso de algumas determinações no soro e no plasma, nomeadamente da glucose, é aconselhável que os animais jejuem durante a noite. O principal motivo deste recomendação reside no facto de a maior variabilidade dos resultados que inevitavelmente ocorreria se os animais não jejuassem poder ocultar efeitos subtis e dificultar as interpretações. No entanto, por outro lado, o jejum desde a véspera pode interferir com o metabolismo geral das fêmeas (prenhes), perturba a lactação e o comportamento de aleitamento e – em especial nos estudos por via alimentar – pode perturbar a exposição diária ao produto químico em estudo. Assim, caso se opte pelo jejum desde a véspera, as análises bioquímicas devem ser efetuadas após observações funcionais a realizar na semana 4 do ensaio para os machos. As mães devem ser retidas por mais um dia após a retirada das crias em, por exemplo, PND 13). As mães devem estar sem comer de um dia para o outro a partir do dia de aleitamento 13-14 e o sangue terminal deve ser utilizado par-a parâmetros de química clínica.

▼M8

— método utilizado para eutanasiar os animais sem lhes causar tensões desnecessárias, que poderiam afetar as concentrações hormonais,

— diferenças ao nível das curvas de calibração dos conjuntos para as determinações hormonais.

60. As amostras de plasma especificamente destinadas a determinações hormonais devem colher-se à mesma hora do dia. Os conjuntos existentes no comércio para determinar concentrações hormonais podem dar valores diferentes.

61. Se os dados históricos de base forem inadequados, deve ponderar-se a determinação da variabilidade dos parâmetros hematológicos e de bioquímica clínica antes de iniciar a exposição dos animais às doses previstas ou – o que será preferível – num conjunto de animais não incluídos nos grupos ensaiados. No caso das fêmeas, os dados devem dizer respeito a animais em lactação.

PATOLOGIA

Autópsia macroscópica

62. Deve ser realizada a todos os animais adultos estudados uma autópsia macroscópica completa e pormenorizada, através do exame cuidadoso da superfície exterior do corpo, dos orifícios, das cavidades craniana, torácica e abdominal e do conteúdo de cada uma destas. Deve prestar-se especial atenção aos órgãos do sistema reprodutivo. Deve registar-se o número de locais de implantação. Os esfregaços vaginais devem ser examinados na manhã do dia da autópsia para determinar a fase do ciclo éstrico e permitir a correlação com a histopatologia dos órgãos reprodutores femininos.

63. Os testículos e os epidídimos, bem como a próstata e as vesículas seminais, com as glândulas coagulantes, de todos os machos adultos devem ser limpos de qualquer tecido aderente, conforme adequado, e o seu peso húmido determinado logo que possível após a dissecação, para evitar a secagem. Além disso, os pesos de órgãos facultativos podem incluir o complexo formado pelos músculos elevatórios do ânus e bulbocavernosos, as glândulas de Cowper e a glande peniana, nos machos, e os ovários (peso húmido) e o útero (incluindo o colo), nas fêmeas; devem conservar-se os ovários, os testículos, os epidídimos, os órgãos sexuais acessórios e todos os órgãos com lesões macroscópicas de todos os animais adultos.

64. Devem conservar-se, no meio de fixação mais adequado ao exame histopatológico subsequente previsto, as glândulas tiroideias de todos os machos e fêmeas adultos, bem como de uma cria de sexo masculino e de outra de sexo feminino, de cada ninhada, colhidas no 13.º dia de vida. A pesagem da tiroide pode realizar-se após fixação. A remoção dos tecidos aderentes à tiroide deve efetuar-se com muito cuidado e também só depois da fixação, para evitar danificar tecidos, o que, a ocorrer, poderia comprometer a análise histopatológica. As colheitas de sangue devem ser efetuadas num determinado ponto a indicar, imediatamente antes da eutanásia dos animais ou integradas nesta, e as amostras devem ser armazenadas em condições adequadas (ver ponto 56).

▼M8

65. Além disso, o fígado, os rins, as glândulas suprarrenais, o timo, o baço, o cérebro e o coração de, pelo menos, cinco machos e fêmeas adultos escolhidos aleatoriamente em cada grupo (excluindo os animais moribundos e/ou eutanasiados antes do termo do estudo) devem ser limpos de qualquer tecido aderente, de forma adequada, e o seu peso húmido deve ser determinado logo que possível após a dissecação, para evitar a secagem. Os órgãos e tecidos que se seguem devem ser conservados num meio de fixação adequado aos mesmos, bem como ao tipo de exame histopatológico subsequente: todas as lesões macroscópicas, o encéfalo (regiões representativas, incluindo os hemisférios cerebrais, o cerebelo e a protuberância anelar), a medula espinal, os olhos, o estômago, o intestino delgado e o intestino grosso (incluindo as placas de Peyer), o fígado, os rins, as glândulas suprarrenais, o baço, o coração, o timo, a traqueia e os pulmões (conservados por injeção de fixador, seguida de imersão), as gónadas (testículos e ovários), os órgãos sexuais secundários (útero e respetivo colo, epidídimos, próstata + vesículas seminais e glândulas de coagulação), a vagina, a bexiga urinária, os gânglios linfáticos – o gânglio linfático mais próximo e outro gânglio linfático, a selecionar em função da experiência anterior do laboratório (16), um nervo periférico (ciático ou tibial), de preferência na vizinhança do músculo, músculo esquelético e osso com medula óssea (corte ou, em alternativa, uma punção recente de medula óssea). Recomenda-se a fixação dos testículos por imersão em fixador de Bouin ou em fixador de Davidson modificado (16)(17)(18). A fixação em formalina não é recomendada para estes tecidos. Para que o fixador penetre rapidamente, deve puncionar-se superficialmente a túnica albugínea com uma agulha, com cuidado, em ambos os polos do órgão. Os resultados clínicos, ou outros, podem aconselhar o exame de outros tecidos. Devem ser conservados também todos os órgãos que as propriedades conhecidas do produto químico em estudo indiciem que serão provavelmente afetados.

66. Os seguintes tecidos podem dar indicações úteis sobre efeitos ao nível do sistema endócrino: gónadas (ovários e testículos), órgãos sexuais secundários (útero – incluindo o colo –, epidídimos, vesículas seminais e glândulas de coagulação, bem como a próstata dorsolateral e ventral), vagina, hipófise, glândulas mamárias masculinas e glândulas suprarrenais. Não existe documentação suficiente sobre alterações das glândulas mamárias masculinas, mas este parâmetro pode ser muito sensível às substâncias com atividade estrogénica. A observação dos órgãos e tecidos não enumerados no ponto 65 é facultativa.

67. As crias mortas e as crias abatidas até ao dia 13 seguinte ao parto, ou pouco depois, devem, pelo menos, ser cuidadosamente examinadas externamente para a pesquisa de anomalias macroscópicas. O aparelho reprodutor externo deve ser objeto de especial atenção, devendo ser inspecionado para a pesquisa de sinais de alterações no desenvolvimento.

Histopatologia

68. Deve efetuar-se uma histopatologia completa dos órgãos e tecidos conservados dos animais selecionados dos grupos de controlo e de dose elevada (com especial destaque para as fases da espermatogénese nos machos e a histopatologia da célula testicular intersticial). A tiroide das crias e dos restantes animais adultos poderá ser examinada quando necessário. Caso o exame destes últimos revele alterações atribuíveis à substância em estudo, devem examinar-se também os animais de todos os lotes restantes. O documento com a referência 10, que contém orientações no domínio da histopatologia, dá mais informações sobre a dissecação, a fixação, a colheita de amostras e a histopatologia de tecidos do sistema endócrino.

69. Devem examinar-se todas as lesões importantes. Para ajudar na elucidação dos NOAEL, devem ser examinados os órgãos-alvo para outros grupos de dose, em especial nos grupos que apresentem um pedido para indicar um NOAEL.

▼M8

70. Caso se tenha constituído um grupo satélite de animais, deve efetuar-se o exame histopatológico dos tecidos e órgãos que tenham revelado alterações nos animais dos grupos expostos a uma dose do produto químico em estudo.

DADOS E RELATÓRIOS

Dados

71. Devem ser apresentar-se os dados individuais de cada animal. Além disso, todos os dados devem ser resumidos num quadro, indicando, para cada grupo de ensaio, o número de animais no início deste, o número de animais encontrados mortos durante o ensaio ou eutanasiados por intervenção humana, a hora da morte de cada animal, a descrição e evolução temporal dos efeitos tóxicos, o número de animais férteis, o número de fêmeas prenhes, o número de animais que apresentam sinais de toxicidade, uma descrição dos sinais de toxicidade observados, incluindo o momento em que surgiram, a duração e a gravidade dos eventuais efeitos tóxicos, os tipos de alterações histopatológicas e quaisquer dados relevantes sobre a ninhada. No apêndice 3 figura um modelo de relatório sob a forma de tabela, que se revelou muito útil para a avaliação de efeitos na reprodução/no desenvolvimento.

72. Se possível, os resultados numéricos devem ser avaliados por um método estatístico corrente adequado. Na comparação de um efeito numa gama de doses, deve evitar-se o recurso a testes t múltiplos. Os métodos estatísticos devem ser escolhidos ao planear o estudo. A análise estatística da DAG e da retenção de mamilo deve basear-se em dados individuais das crias, tendo em conta os efeitos da ninhada. Se for adequado, a ninhada é escolhida como unidade de análise. A análise estatística do peso corporal das crias deve basear-se em dados relativos a cada indivíduo, tendo em conta o tamanho da ninhada. Devido às dimensões limitadas do estudo, as análises estatísticas, sob a forma de ensaios de significância, têm um valor limitado para muitos parâmetros, em especial os parâmetros de reprodução. Alguns dos métodos mais utilizados, especialmente os ensaios paramétricos para medição da tendência central, são inadequados. Se se utilizarem análises estatísticas, o método escolhido deve adequar-se à distribuição da variável examinada, que deve ser selecionada antes do início do estudo.

Avaliação dos resultados

73. As conclusões do presente estudo de toxicidade devem ser ponderadas com base nos efeitos observados, na autópsia e nos resultados microscópicos. A análise deverá considerar a relação (ou a ausência desta) entre a dose do produto químico de ensaio e a presença ou ausência, incidência e gravidade das anomalias, incluindo lesões macroscópicas, órgãos identificados como alvos, infertilidade, alterações da reprodução e procriação, alterações do peso corporal, efeitos na mortalidade e quaisquer outros efeitos tóxicos.

74. Devido ao curto período de tratamento dos machos, a histopatologia dos testículos e dos epidídimos deve ser tida em conta juntamente com os dados de fertilidade, aquando da avaliação dos efeitos para a reprodução masculina. A utilização de dados históricos de controlo sobre a reprodução/o desenvolvimento (por exemplo, para as dimensões da ninhada, a DAG, a retenção de mamilo, os níveis séricos de T4), se disponíveis, pode também ser útil para auxiliar a interpretação do estudo.

75. Para fins de controlo de qualidade, propõe-se a compilação de dados de controlo históricos e o cálculo de coeficientes de variação dos dados numéricos, especialmente no caso dos parâmetros relacionados com a deteção de perturbadores do sistema endócrino. Estes dados podem ser utilizados para fins comparativos na avaliação de estudos reais.

▼M8

Relatório de ensaio

76. O relatório de ensaio deve conter as seguintes informações:

Produto químico em estudo:

— origem, número de lote e data-limite de utilização, se conhecida

— estabilidade do produto químico em estudo, se conhecida.

Substância monocomponente:

— aspeto físico, hidrossolubilidade e outras propriedades físico-químicas pertinentes;

— dados de identificação química, como as denominações IUPAC ou CAS, número CAS, código SMILES ou InChI, fórmula estrutural, pureza, identidade química das impurezas, caso se justifique e seja exequível, etc.

Substância multicomponentes, UVCB e misturas:

— caracterizada, na medida do possível, pela identidade química (ver acima), pela ocorrência quantitativa e pelas principais propriedades físico-químicas dos componentes.

Veículo (se adequado):

— justificação da escolha do veículo, se não for água.

Animais utilizados no ensaio:

— espécie e estirpe utilizadas;

— número, idade e sexo dos animais;

— proveniência, condições de alojamento, alimentação, etc.;

— peso individual dos animais no início do ensaio

— caso não sejam utilizados ratazanas, justificação do recurso a outra espécie.

Condições de realização do ensaio:

— fundamentação da escolha das doses;

— elementos relativos à formulação do produto químico em estudo/à incorporação do mesmo na dieta dos animais; concentração atingida, estabilidade e homogeneidade da preparação;

▼**M8**

— elementos relativos à administração do produto químico em estudo;

— se pertinente, equivalência entre a concentração do produto químico em estudo na dieta ou na água de beber, expressa em ppm, e a dose real, expressa em mg/kg de peso corporal/dia,

— elementos relativos à qualidade dos alimentos e da água;

— descrição pormenorizada do processo de aleatorização para selecionar as crias para abate, se este for seletivo.

Resultados:

— peso corporal e suas alterações;

— consumo de alimentos e de água, se pertinente,

— reações tóxicas em função do sexo e da dose administrada, nomeadamente na fertilidade, na gestação e outros sinais de toxicidade;

— duração da gestação;

— efeitos nocivos, ou outros, na reprodução, na descendência, no crescimento pós-natal, etc.;

— natureza, intensidade e duração dos sinais clínicos observados (reversíveis ou irreversíveis),

— avaliações da atividade sensorial, da força de preensão e da atividade motora;

— análises hematológicas com valores de base relevantes;

— análises bioquímicas com valores de base relevantes;

— número de fêmeas adultas com ciclo éstrico normal ou anormal, e duração do ciclo;

— número de nados-vivos e de perdas pós-implantação;

— número de crias com anomalias macroscópicas visíveis, avaliação bruta dos órgãos genitais externos, número de crias são significativamente menores do que as crias de controlo correspondentes;

— momento do óbito durante o estudo, ou indicação de que os animais sobreviveram até ao final do mesmo;

— número de implantações, dimensão da ninhada e pesos da ninhada no momento do registo;

— dados relativos à massa corporal das crias;

— DAG de todas as crias (e peso corporal no dia da medição da DAG);

— retenção de mamilo em crias do sexo masculino,

— níveis das hormonas da tiroide no dia 13, para as crias e os machos adultos (bem como para as mães e as crias no dia 4, caso tenham sido medidos)

— peso corporal no momento do abate e peso dos órgãos dos animais progenitores;

— resultados das autópsias;

— descrição pormenorizada dos resultados histopatológicos;

— dados de absorção (se disponíveis);

— tratamento estatístico dos resultados, se for o caso.

Discussão dos resultados.

Conclusões.

▼M8

Interpretação dos resultados

77. O estudo proporciona avaliações da toxicidade para a reprodução/o desenvolvimento associada à administração de doses repetidas. Uma vez que o estudo incide tanto nos parâmetros de toxicidade geral como de toxicidade para a reprodução/o desenvolvimento, os resultados obtidos permitem estabelecer uma distinção entre os efeitos para a reprodução/o desenvolvimento não associados a uma toxicidade geral e os efeitos nocivos apenas induzidos a níveis igualmente tóxicos para os progenitores (ver pontos 7-11). Pode fornecer uma indicação da necessidade de realizar mais estudos, bem como orientações para a conceção de estudos subsequentes. Para a interpretação dos resultados sobre a reprodução e o desenvolvimento, deve consultar-se o documento de orientações 43 da OCDE (19). O documento de orientação 106 da OCDE sobre a avaliação histológica dos ensaios endócrinos e de reprodução em roedores (16) fornece informações sobre a preparação e a avaliação de órgãos (endócrinos) e de esfregaços vaginais que podem ser úteis para a presente *Test Guideline*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(1) OCDE (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. Disponível mediante pedido junto da Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Económicos, Paris

(2) OCDE (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokyo, 27th-29th October, 1992. Disponível mediante pedido junto da Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Económicos, Paris

(3) Mitsumori K., Kodama Y., Uchida O., Takada K., Saito M. Naito K., Tanaka S., Kurokawa Y., Usami, M., Kawashima K., Yasuhara K., Toyoda K., Onodera H., Furukawa F., Takahashi M. and Hayashi Y. (1994). Confirmation Study, Using Nitro-Benzene, of the Combined Repeat Dose and Reproductive/ Developmental Toxicity Test Protocol Proposed by the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). J. *Toxicol*, Sci., 19, 141-149.

(4) Tanaka S., Kawashima K., Naito K., Usami M., Nakadate M., Imaida K., Takahashi M., Hayashi Y., Kurokawa Y. and Tobe M. (1992). Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test (OECD): Familiarization Using Cyclophosphamide. Fundam. Appl. *Toxicol*., 18, 89-95.

(5) OCDE (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998, Available upon request at Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris

(6) OCDE (2015). Feasibility Study for Minor Enhancements of TG 421/422 with ED Relevant Endpoints. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 217), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(7) OCDE (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluations, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 19), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

▼**M8**

(8) Goldman J.M., Murr A.S., Buckalew A.R., Ferrell J.M.and Cooper R.L. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies, *Birth Defects Research*, Part B, 80 (2), 84-97.

(9) Sadleir R.M.F.S. (1979). Cycles and Seasons, in Auston C.R. and Short R.V. (Eds.), Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization, Cambridge, New York.

(10) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document (No 60).

(11) Moser V.C., McDaniel K.M. and Phillips P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol*. Appl. *Pharmacol*., 108, 267--283.

(12) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C. and Riley M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. *Toxicol*., 1, 233-236.

(13) Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13, 599-609.

(14) Gallavan R.H. Jr, J.F. Holson, D.G. Stump, J.F. Knapp and V.L. Reynolds. (1999). «Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights», Reproductive Toxicology, 13: 383-390.

(15) OCDE (2013). Guidance Document in Support of the Test Guideline on the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 151). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(16) OECD (2009).Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 106) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(17) Hess RA e Moore B.J. (1993). Histological Methods for the Evaluation of the Testis. In: Methods in Reproductive Toxicology, Chapin RE and Heindel JJ (Eds.). Academic Press: San Diego, CA, pp. 52-85.

(18) Latendresse JR, Warbrittion AR, Jonassen H, Creasy DM. (2002). Fixation of Testes and Eyes Using a Modified Davidson's Fluid: Comparison with Bouin's Fluid and Conventional Davidson's fluid. *Toxicol. Pathol*. 30, 524-533.

(19) OCDE (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 43), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(20) OECD (2011), Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption (No 150), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

▼**M8**

Apêndice 1

DEFINIÇÕES (VER TAMBÉM O DOCUMENTO GD 150 DA OCDE) (29)

Atividade anfrogénica capacidade de um produto químico de agir como uma hormona androgénica natural (por exemplo, a testosterona) num mamífero.

Atividade antiandrogénica capacidade de um produto químico de suprimir a ação de uma hormona androgénica natural (por exemplo a testosterona) num mamífero.

Atividade antiestrogénica capacidade de um produto químico de suprimir a ação de uma hormona estrogénica natural (por exemplo, o 17ß-estradiol) num mamífero.

Atividade antitiroideia capacidade de um produto químico de suprimir a ação de uma hormona da tiroide natural (por exemplo, a T_3) num mamífero.

Atividade estrogénica capacidade de um produto químico de agir como hormona estrogénica natural (por exemplo o 17ß-estradiol) num mamífero.

Atividade tiroideia capacidade de um produto químico de agir como uma hormona da tiroide natural (por exemplo, a T_3) num mamífero.

Diminuição da fertilidade reflete perturbações de funções ou capacidades reprodutoras masculinas ou femininas.

Dosagem termo geral que inclui a dose, a sua frequência e a duração da aplicação da dose.

Dose quantidade de produto químico em estudo administrada. Exprime-se em peso diário do produto químico em estudo por unidade de peso corporal do animal de ensaio (por exemplo mg/kg de peso corporal/dia) ou sob a forma de uma concentração constante nos alimentos.

NOAEL abreviatura de «*No Observed Adverse Effect Level*» («nível sem observação de efeitos nocivos»), que constitui a dose máxima que não produz efeitos nocivos observáveis da exposição à mesma.

Produto químico uma substância ou mistura.

Produto químico em estudo qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado o presente método de ensaio.

Toxicidade evidente termo geral que descreve a existência de sinais claros de toxicidade após a administração do produto químico em estudo. Os sinais em causa devem ser suficientes para a avaliação dos perigos e devem ser tais que seja de prever que o aumento da dose administrada provoque o aparecimento de sinais intensos de toxicidade e provável mortalidade.

Toxicidade materna efeitos nocivos nas fêmeas prenhes, que se apresentam especificamente (efeito direto) ou não especificamente (efeito indireto) e estão relacionados com a gestação.

Toxicidade para a reprodução designa efeitos prejudiciais na descendência e/ou perturbações de funções ou capacidades reprodutoras masculinas ou femininas.

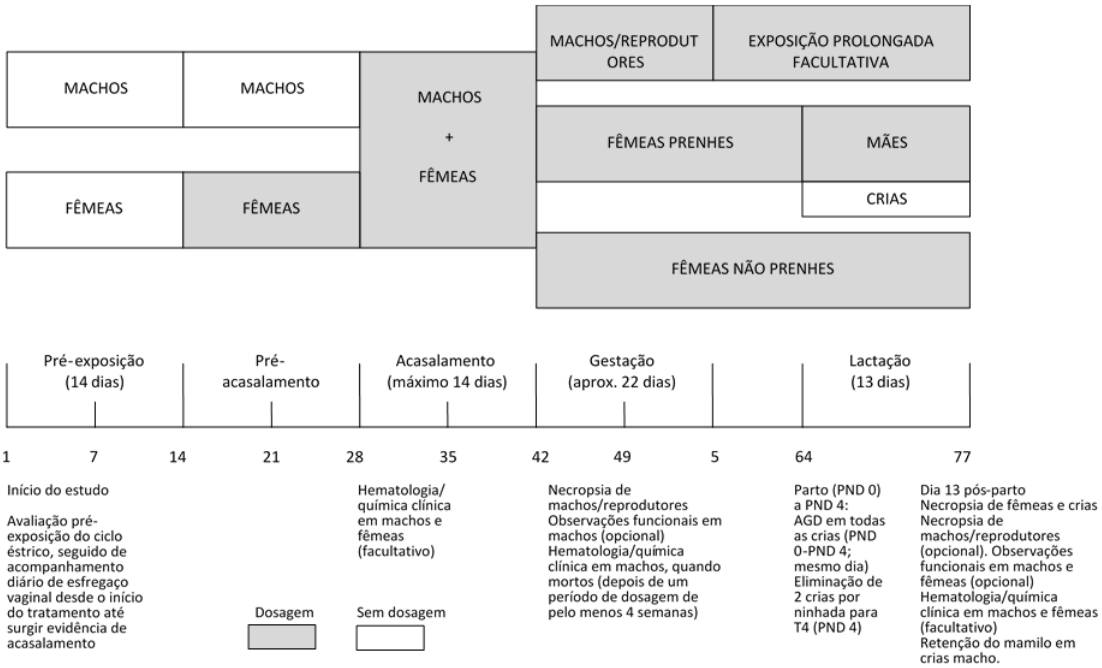
Toxicidade para o desenvolvimento a manifestação de toxicidade reprodutiva, sob a forma de perturbações estruturais pré-natal, peri-natal e pós-natal ou perturbações funcionais nos descendentes.

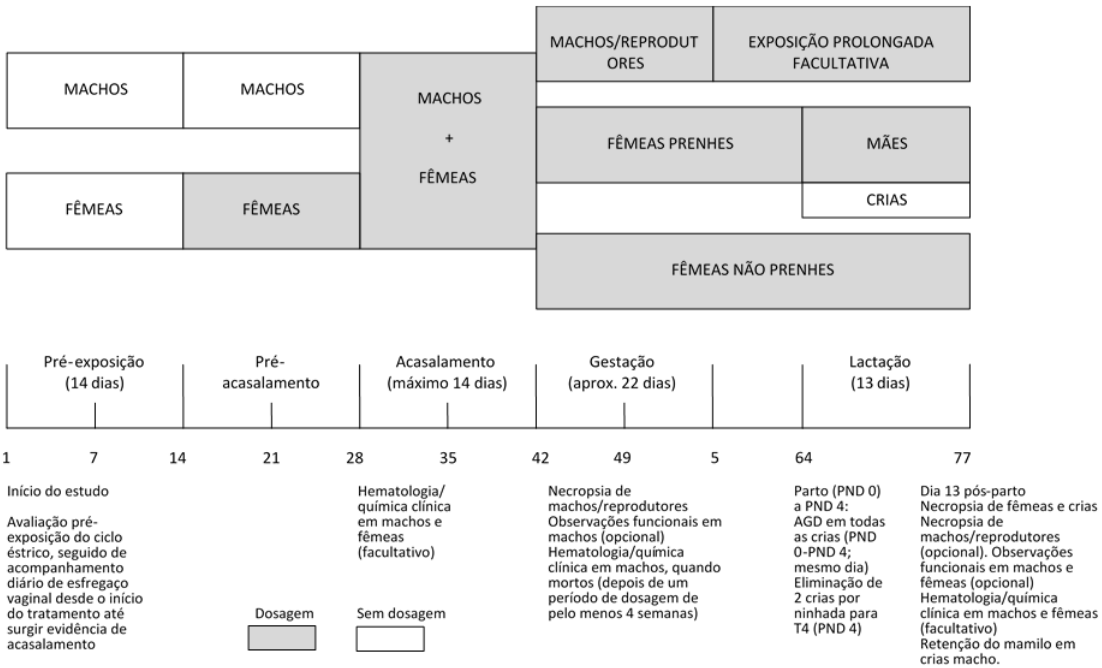
Validação processo científico concebido para caracterizar as limitações e os imperativos operacionais de um método de ensaio e demonstrar a fiabilidade e pertinência do mesmo para um determinado fim.

▼**M8**

Apêndice 2

DIAGRAMA DO CALENDÁRIO EXPERIMENTAL, COM INDICAÇÃO DA DURAÇÃO MÁXIMA DO ESTUDO, COM BASE NUM PERÍODO TOTAL DE ACASALAMENTO DE 14 DIAS





▼**M8**

Apêndice 3

RELATÓRIO DE SÍNTESE SOBRE OS EFEITOS NA REPRODUÇÃO/NO DESENVOLVIMENTO

OBSERVAÇÕES	VALORES				
Dosagem (unidades).....	0 (controlo)	…	…	…	…
Pares iniciais (N)					
Ciclo éstrico (pelo menos, o comprimento médio e a frequência de ciclos irregulares)					
Fêmeas que apresentam indícios de copulação (N)					
Fêmeas que engravidaram (N)					
Conceção nos dias 1-5 (N)					
Conceção nos dias 6 -... ([1]) (N)					
Gestação ≤ 21 dias (N)					
Gestação = 22 dias (N)					
Gravidez ≥ 23 dias (N)					
Mães com nados-vivos (N)					
Mães com nados-vivos no dia 4 pp (N)					
Implantes/mãe (média)					
Crias vivas/mãe à nascença (média)					
Crias vivas/mãe no dia 4 (média)					
Rácio sexual (m/f) à nascença (média)					
Rácio sexual (m/f), no dia 4 (média)					
Peso da ninhada à nascença (média)					
Peso da ninhada no dia 4 (média)					
Peso da cria à nascença (média)					
Peso da cria no momento da medição da DAG (média dos machos, média das fêmeas).					
DAG da cria no mesmo dia pós-natal, dia 4 após o nascimento (média dos machos, média das fêmeas, nota PND)					
Peso das crias no dia 4 (média)					
Peso das crias no dia 13 (média)					

▼M8

OBSERVAÇÕES	VALORES				
Retenção de mamilo das crias do sexo masculino no dia 13 (média)					
CRIAS ANORMAIS					
Mães com 0					
Mães com 1					
Mães com ≥ 2 duas crias					
PERDA DE CRIAS					
Pré-natal (implantações menos nados-vivos)					
Fêmeas com 0					
Fêmeas com 1					
Fêmeas com 2					
Fêmeas com ≥ 3					
Pós-natal (nados-vivos menos vivos no dia 13 pós-natal)					
Fêmeas com 0					
Fêmeas com 1					
Fêmeas com 2					
Fêmeas com ≥ 3					

([1]) Último dia do período de acasalamento

▼M8

B.65. MÉTODO DE ENSAIO *IN VITRO* DE MEMBRANA DE ESTANQUIDADE PARA A CORROSÃO CUTÂNEA

INTRODUÇÃO

1. O presente método de ensaio é equivalente à *Test Guideline* 435 da OCDE (2015). Entende-se por corrosão da pele a produção de danos irreversíveis nos tecidos cutâneos, que se manifestam na forma de necrose visível em toda a epiderme e atingindo a derme, por aplicação de um produto químico em estudo, definido pelo Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos da ONU (GHS) (1) e pelo Regulamento (UE) n.º 1272/2008 da União Europeia relativo à classificação, rotulagem e embalagem de substâncias e misturas (CRE) ([1]). Trata-se de um método de membrana de estanquidade *in vitro* que pode ser utilizado para identificar produtos químicos corrosivos. Utiliza uma membrana artificial concebida para reagir a produtos químicos corrosivos de forma similar à pele animal *in situ*.

2. A corrosividade cutânea tem sido tradicionalmente avaliada pela aplicação do produto químico em estudo à pele de animais vivos, seguida da avaliação dos danos causados aos tecidos após um determinado período (2). Além do presente, foi adotada uma série de outros métodos de ensaio *in vitro* alternativos (3)(4) ao procedimento normalizado da pele de coelho *in vivo* (capítulo B.4 do presente anexo, equivalente à *Test Guideline* 404 da OCDE), para identificar produtos químicos corrosivos (2). A estratégia de ensaio sequencial por etapas do GHS da ONU e o documento de orientação da OCDE sobre abordagens integradas de ensaio e avaliação (IATA) para a corrosão e irritação da pele recomendam o uso de métodos de ensaio *in vitro* validados e aceites nos módulos 3 e 4 (1) (5). A IATA descreve vários módulos que contêm fontes de informação e ferramentas de análise: (i) fornece orientações sobre como integrar e utilizar os ensaios existentes e os dados não provenientes de ensaios para a avaliação dos potenciais de irritação cutânea e de corrosão cutânea dos produtos químicos e (ii) propõe uma abordagem em caso de necessidade de ensaios complementares, mesmo quando se obtêm resultados negativos (5). Nesta abordagem modular, os resultados positivos dos métodos de ensaio *in vitro* podem ser utilizados para classificar um produto químico como corrosivo, sem a necessidade de experimentação animal, reduzindo e tornando mais seletiva a utilização de animais em ensaios e evitando a dor e o sofrimento que podem ocorrer quando são usados animais para esta finalidade.

3. Foram realizados estudos de validação do modelo *in vitro* de membrana de estanquidade disponível comercialmente com a denominação Corrositex ® (6) (7) (8), estudos esses que apresentaram uma exatidão global de previsão de corrosividade cutânea de 79 % (128/163), uma sensibilidade de 85 % (76/89) e uma especificidade de 70 % (52/74) para 163 substâncias e misturas constantes de uma base de dados (7). Atendendo à sua validade reconhecida, este método de referência validado (MRV) foi recomendado para utilização no âmbito de uma estratégia de ensaio sequencial destinada a avaliar o potencial de corrosão dérmica de produtos químicos (5) (7). Antes de se poder utilizar um método proposto de ensaio *in vitro* da membrana de estanquidade para a corrosão cutânea para efeitos normativos, é necessário determinar a sua fiabilidade e adequação (precisão), bem como os limites da utilização proposta, para garantir a similaridade com o MRV (9), de acordo com os requisitos das normas de desempenho (10). A aceitação mútua de dados da OCDE só será garantida após a revisão e inclusão de qualquer método novo ou atualizado proposto na sequência das substâncias prioritárias, para inclusão nas diretrizes de ensaio correspondentes da OCDE.

([1]) Regulamento (CE) n.º 1272/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16 de dezembro de 2008, relativo à classificação, rotulagem e embalagem de substâncias e misturas, que altera e revoga as Diretivas 67/548/CEE e 1999/45/CE, e altera o Regulamento (CE) n.º 1907/2006 (JO L 353 de 31.12.2008).

▼M8

Atualmente, apenas um método *in vitro* é abrangido pela *Test Guideline* 435 da OCDE (o presente método de ensaio, que utiliza o já referido modelo Corrositex®).

4. Outros métodos de ensaio para determinação da corrosividade cutânea baseiam-se no uso de pele humana reconstruída (TG 431 OCDE) (3) e em pele de ratazana isolada (TG 430 da OCDE) (4). A mesma diretriz prevê a subcategorização dos produtos químicos corrosivos nas três subcategorias de corrosividade do sistema GHS da ONU e nos três grupos de embalagem da ONU para o risco de corrosividade. Esta *Test Guideline* foi adotada em 2006 e atualizada em 2015, para ter em conta o documento de orientação da IATA e para atualizar a lista de substâncias de referência.

DEFINIÇÕES

5. As definições utilizadas constam do apêndice.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES

6. O ensaio descrito no presente método permite a identificação de produtos químicos corrosivos, bem como a subcategorização de produtos químicos em estudo corrosivos de acordo com o GHS/CRE (quadro 1). Além disso, pode ser usado para fundamentar decisões sobre a corrosividade e a não corrosividade de determinadas classes de produtos químicos, por exemplo, ácidos orgânicos e inorgânicos, derivados de ácidos ([1]) e bases para fins de ensaio (7)(11)(12). Descreve um procedimento genérico semelhante ao método de ensaio de referência validado (7). Embora o presente método não forneça informações adequadas sobre a irritação da pele, deve notar-se que o método de ensaio B.46 (equivalente à *Test Guideline* 439 da OCDE) incide especificamente no efeito de irritação cutânea da pele *in vitro* (13). Para uma avaliação exaustiva dos efeitos locais na pele após uma exposição única por via dérmica, deve consultar-se o documento de orientação da OCDE relativo a abordagens integradas de ensaio e avaliação (5).

Quadro 1

Categoria e subcategorias de corrosividade cutânea do sistema GHS da ONU ([1])

Categoria de corrosividade (categoria 1) (para entidades que não utilizam subcategorias)	Subcategorias de corrosividade potencial ([1]) (para entidades que utilizam subcategorias, incluindo o Regulamento CRE)	Corrosivo em ≥ 1 de 3 animais	
		Exposição	Observação
Corrosivo	Subcategoria de corrosividade 1A	≤ 3 minutos	≤ 1 hora
	Subcategoria de corrosividade 1B	> 3 minutos/ ≤ 1 hora	≤ 14 dias
	Subcategoria de corrosividade 1C	> 1 hora/ ≤ 4 horas	≤ 14 dias

([1]) Na UE, o Regulamento CRE aplica as três subcategorias de corrosão cutânea — 1A, 1B e 1C.

7. Uma limitação do método de referência validado (7) reside em que muitos produtos químicos não corrosivos e alguns produtos químicos corrosivos podem não ser adequados para ensaio, com base nos resultados do ensaio de compatibilidade inicial (ver ponto 13). Muitas substâncias químicas aquosas com pH compreendido entre 4,5 e 8,5 não são adequadas para o ensaio; contudo, 85 % dos produtos químicos deste intervalo de pH estudados não se

([1]) «Derivado de ácido» é uma denominação de classe não específica, designando, de forma genérica, um ácido produzido a partir de um produto químico, quer diretamente, quer por modificação ou substituição parcial. Esta classe inclui anidridos, ácidos haloacéticos, sais e outros tipos de produtos químicos.

▼M8

revelaram corrosivos em ensaios com animais (7). O método da membrana de estanquidade *in vitro* pode ser utilizado para estudar sólidos (solúveis ou insolúveis na água), líquidos (aquosos ou não aquosos) e emulsões. No entanto, os produtos químicos em estudo que não provocam uma alteração detetável no ensaio de compatibilidade (ou seja, uma mudança de cor no CDS do sistema de deteção do método de ensaio de referência validado) não podem ser ensaiados com o método da membrana de estanquidade, devendo-lhes ser aplicados outros métodos de ensaio.

PRINCÍPIO DO ENSAIO

8. O sistema do ensaio tem dois componentes: uma biobarreira macromolecular sintética e um sistema de deteção de produtos químicos (CDS); o método deteta, através da barreira da membrana CDS, os danos causados por produtos químicos em estudo corrosivos após a aplicação do produto em causa na superfície da barreira da membrana macromolecular sintética (7), provavelmente pelo(s) mesmo(s) mecanismo(s) de corrosão que age(m) na pele viva.

9. A penetração da barreira da membrana (ou rutura) pode ser medida por um conjunto de procedimentos ou CDS, incluindo a alteração da cor de um indicador de pH ou de qualquer outra propriedade da solução do indicador sob a barreira.

10. A barreira da membrana deve ser avaliada para ser válida, ou seja, adequada e fiável para o uso pretendido. Contudo, é necessário garantir que as diferentes preparações são compatíveis com as propriedades da barreira, por exemplo, que são capazes de constituir uma barreira a produtos químicos corrosivos e de permitir classificar as propriedades dos produtos químicos corrosivos nas várias subcategorias de corrosividade do GHS da ONU (1). A classificação atribuída baseia-se no tempo que o produto demora a penetrar na membrana até atingir a solução do indicador.

DEMONSTRAÇÃO DE COMPETÊNCIA

11. Antes de utilizarem de forma rotineira o método da barreira de membrana *in vitro* em conformidade com o presente método de ensaio, os laboratórios devem demonstrar a sua competência técnica, classificando corretamente as doze substâncias recomendadas no quadro 2. No caso de uma substância incluída na lista estar indisponível ou sempre que se justifique, pode ser utilizada outra substância para a qual estejam disponíveis dados adequados de referência *in vivo* e *in vitro* (por exemplo, da lista de produtos químicos de referência (10)), desde que sejam aplicados os critérios de seleção descritos no quadro 1.

Quadro 2

Substâncias para a demonstração de competência ([1])

Substância ([2])	N.º CAS	Classe química	Subcategoria *in vivo* do sistema GHS da ONU ([3])	Subcategoria *in vitro* do sistema GHS da ONU ([3])
Trifluoreto de boro di-hidratado	13319-75-0	Ácido inorgânico	1A	1A
Ácido nítrico	7697-37-2	Ácido inorgânico	1A	1A
Pentacloreto de fósforo	10026-13-8	Precursor de ácido inorgânico	1A	1A
Cloreto de valerilo	638-29-9	Cloreto de acilo	1B	1B
Hidróxido de sódio	1310-73-2	Base inorgânica	1B	1B

▼M8

Substância ([2])	N.º CAS	Classe química	Subcategoria *in vivo* do sistema GHS da ONU ([3])	Subcategoria *in vitro* do sistema GHS da ONU ([3])
1-(2-Aminoetil)piperazina	140-31-8	Amina alifática	1B	1B
Cloreto de benzenossulfonilo	98-09-9	Cloreto de acilo	1 C	1 C
N,N-Dimetilbenzilamina	103-83-3	Anilina	1 C	1 C
Tetraetilenopentamina	112-57-2	Amina alifática	1 C	1 C
Eugenol	97-53-0	Fenol	NC	NC
Acrilato de nonilo	2664-55-3	Acrilato/metacrilato	NC	NC
Bicarbonato de sódio	144-55-8	Sal inorgânico	NC	NC

([1]) As doze substâncias acima enumeradas incluem três substâncias de cada uma das três subcategorias GHS da ONU para substâncias corrosivas e três substâncias não corrosivas, estão facilmente disponíveis em fornecedores comerciais, e a subcategoria GHS da ONU baseia-se em resultados de ensaios *in vivo* de alta qualidade. Estas substâncias são retiradas da lista de 40 substâncias de referência incluídas na lista mínima de produtos químicos identificados para demonstrar a exatidão e a fiabilidade de métodos de ensaio estrutural e funcionalmente semelhantes ao método de ensaio de referência validado; foram selecionadas a partir das 163 substâncias químicas de referência originalmente utilizadas para validar o método de ensaio de referência (Corrositex®) (7) (10) (14). O objetivo deste processo de seleção foi incluir, tanto quanto possível, produtos químicos que: sejam representativos da gama de respostas de corrosividade (p. ex., não corrosivo; corrosivos dos grupos de embalagem I, II e III, da ONU) cujo método de ensaio de referência validado possa medir ou prever; sejam representativos das classes de produtos químicos utilizados no processo de validação; tenham estruturas químicas bem definidas; produzam resultados reprodutíveis no método de ensaio de referência validado; produzam resultados definitivos no método de ensaio de referência *in vivo*; estejam comercialmente disponíveis e não tenham custos de eliminação proibitivos (14).

([2]) Substâncias ensaiadas puras ou com ≥ 90 % de pureza.

([3]) Os grupos de embalagem da ONU correspondentes são os grupos I, II e III, respetivamente, para as subcategorias 1A, 1B e 1C do sistema GHS da ONU. NC = Não corrosivo.

PROCEDIMENTO

12. Os pontos seguintes descrevem os componentes e os procedimentos de um método de ensaio de membrana de estanquidade artificial, para avaliação da corrosão (7)(15), com base no MRV, designadamente o MRV Corrositex® disponível no comércio. A membrana de estanquidade e o indicador de compatibilidade, bem como as soluções de categorização podem ser construídos, elaborados ou obtidos comercialmente, como é o caso do MRV Corrositex®. Existe uma amostra do protocolo do método de ensaio para o método de ensaio de referência validado (7). Os ensaios devem ser realizados à temperatura ambiente (17-25 °C) e os componentes devem cumprir as condições que se descrevem de seguida.

Ensaio de compatibilidade do produto químico em estudo

13. Antes da realização do ensaio de membrana de estanquidade, efetua-se um ensaio de compatibilidade para determinar se o produto químico em estudo é detetável pelo CDS. Se o CDS não detetar o produto em causa, o método de ensaio de membrana de estanquidade não é adequado para avaliar a potencial corrosividade desse produto, devendo utilizar-se outro método de ensaio. O CDS e as condições de exposição utilizadas para o ensaio de compatibilidade devem refletir a exposição no ensaio de membrana de estanquidade subsequente.

Ensaio de classificação dos produtos químicos em estudo em função do tempo

14. Se for adequado no contexto do método de ensaio, um produto químico em estudo que tenha sido qualificado pelo teste de compatibilidade deve ser sujeito a um ensaio de classificação em função do tempo (ensaio de rastreio

▼M8

para distinguir os ácidos ou bases fracos dos fortes). Por exemplo, no método de referência validado, utiliza-se um ensaio de classificação em função do tempo para indicar qual de dois períodos se deve utilizar para a deteção de um potencial de acidez ou alcalinidade significativo. Devem utilizar-se dois períodos diferentes para determinar a corrosividade para a pele e a respetiva subcategoria no sistema GHS da ONU, com base no potencial de acidez ou alcalinidade do produto químico em estudo.

COMPONENTES DO MÉTODO DE ENSAIO DE MEMBRANA DE ESTANQUIDADE

Membrana de estanquidade

15. A membrana de estanquidade tem dois componentes: um gel aquoso macromolecular proteico e uma membrana permeável de apoio. O gel proteico deve ser impermeável a líquidos e sólidos, mas pode ser corroído e tornar-se permeável. A membrana de estanquidade deve ser armazenada inteira, em condições previamente determinadas e que impeçam a deterioração do gel, por exemplo, por secagem, crescimento microbiano, deslocação, fendas, para que o seu desempenho não seja afetado. Deve determinar-se o período de armazenagem aceitável, não devendo as preparações da membrana de estanquidade ser utilizadas após esse período.

16. A membrana de apoio permeável confere apoio mecânico ao gel proteico durante o processo de gelificação e de exposição ao produto químico em estudo. Deve impedir o amolecimento ou a deslocação do gel e ser facilmente permeável a todos os produtos químicos em estudo.

17. O gel proteico, constituído, por exemplo, por queratina, colagénio ou misturas de proteínas que formam uma matriz de gel serve de alvo para o produto químico em estudo. A matéria proteica é colocada sobre a superfície da membrana de apoio, onde gelifica antes de a membrana de estanquidade ser colocada sobre a solução do indicador. O gel proteico deve manter sempre a mesma espessura e densidade e não exibir bolhas de ar ou defeitos que possam afetar a sua integridade funcional.

Sistema de deteção química (CDS)

18. A solução do indicador, que é a mesma utilizada para o ensaio de compatibilidade, deve reagir à presença do produto químico em estudo. Deve utilizar-se um indicador de pH corante ou com uma combinação de corantes – por exemplo, vermelho de cresol e alaranjado de metilo – que mude de cor devido à presença do produto químico. O sistema de medição pode ser visual ou eletrónico.

19. Os sistemas de deteção desenvolvidos para detetar a passagem do produto químico em estudo através da membrana de estanquidade devem ser avaliados quanto à sua adequação e fiabilidade, a fim de definir a gama de produtos químicos que podem ser detetados e os limites quantitativos de deteção.

REALIZAÇÃO DO ENSAIO

Montagem dos componentes do método de ensaio

20. A membrana é colocada num frasco (ou tubo) que contém a solução do indicador, de modo a que a membrana de apoio esteja totalmente em contacto com a solução do indicador e que não se observem bolhas de ar. Deve ter-se o cuidado de assegurar a integridade da membrana.

▼M8

Aplicação do produto químico em estudo

21. É cuidadosamente espalhada e uniformemente distribuída pela superfície superior da membrana uma quantidade adequada do produto químico em estudo, como, por exemplo, 500 µl de um líquido ou 500 mg de um sólido finamente pulverizado (7). Prepara-se para cada substância, e para os despectivos controlos, um número adequado de replicados – por exemplo, quatro (7) (ver pontos 23 a 25). Regista-se o momento da aplicação do produto químico em estudo à membrana. Para assegurar o registo exato dos tempos de corrosão curtos, procede-se ao escalonamento dos tempos de aplicação do produto químico nos frascos replicados.

Medição das penetrações na membrana

22. Cada frasco é adequadamente monitorizado e é registado o momento da primeira mudança na solução do indicador, ou seja, a penetração da membrana, determinando-se o tempo decorrido entre a aplicação e a penetração da membrana.

Controlos

23. Nos ensaios que utilizem um veículo ou solvente com o produto químico de estudo, o veículo ou solvente deve ser compatível com o sistema da membrana de estanquidade, ou seja, não deve alterar a integridade sistema da membrana nem a corrosividade do produto químico. Se for caso disso, o controlo do solvente (ou do veículo) deve ser ensaiado em simultâneo com o produto químico em estudo, a fim de demonstrar a compatibilidade do solvente com o sistema de membrana.

24. Deve ensaiar-se em simultâneo com o produto químico em estudo um controlo positivo (corrosivo) com corrosividade intermédia – por exemplo, atividade de 110 ±15 mg de hidróxido de sódio (subcategoria de corrosividade 1B do GHS da ONU) (7) –, para avaliar se o sistema está a funcionar de forma aceitável. Um segundo controlo positivo com a mesma classe química do produto químico em estudo pode ser útil para avaliar o potencial de corrosividade relativo de um produto químico corrosivo. Devem selecionar-se controlo(s) positivo(s) de corrosividade intermédia (por exemplo, da subcategoria 1B do GHS da ONU), a fim de detetar mudanças no tempo de penetração, que pode ser inaceitavelmente maior ou menor do que o valor de referência estabelecido, indicando assim que o sistema de teste não funciona corretamente. Para o efeito, os produtos químicos extremamente corrosivos (subcategoria 1A do sistema GHS da ONU) ou não corrosivos são de utilidade limitada. Um produto químico corrosivo da subcategoria 1B do sistema GHS da ONU permitirá detetar um período demasiado rápido ou demasiado lento. Uma substância fracamente corrosiva (subcategoria 1C do sistema GHS da ONU) pode ser utilizada como controlo positivo, com vista a medir a capacidade do método de ensaio para estabelecer uma distinção sistemática entre substâncias químicas fracamente corrosivas e não corrosivas. Independentemente da abordagem utilizada, deve definir-se uma gama aceitável de respostas ao controlo positivo com base na gama histórica de momentos de avanço para o(s) controlo(s) positivo(s) utilizado(s), como, por exemplo, os desvios-padrão médios 2-3. Em cada estudo, deve determinar-se o tempo de penetração exato para o controlo positivo, para que possam ser detetados desvios fora da gama aceitável.

25. Um controlo negativo (não corrosivo) – por exemplo, 10 % de ácido cítrico e 6 % de ácido propiónico (7) – também devem ser ensaiados simultaneamente com o produto químico em estudo, constituindo outra medida de controlo de qualidade para demonstrar a integridade funcional da membrana.

▼M8

Critérios de aceitabilidade do estudo

26. Atendendo aos parâmetros temporais estabelecidos para cada subcategoria de corrosividade do sistema GHS da ONU, o tempo (em minutos) decorrido entre a aplicação do produto químico em estudo na membrana e a penetração nesta é utilizado para prever a corrosividade do produto em causa. Para que um estudo possa ser considerado aceitável, o controlo positivo paralelo deve produzir o tempo de penetração esperado (por exemplo, 8-16 min até atingir o hidróxido de sódio, se usado como controlo positivo); o controlo negativo simultâneo não deve ser corrosivo. Se for utilizado, o controlo de solvente simultâneo não deve ser corrosivo nem deve alterar a corrosividade potencial do produto químico. Antes de utilizarem um método de ensaio de rotina conforme com o presente método de ensaio, os laboratórios devem demonstrar a sua competência técnica utilizando as doze substâncias recomendadas no quadro 2. No caso dos novos métodos «me-too», desenvolvidos no âmbito deste método de ensaio, que são estruturalmente semelhantes ao método de referência validado (14), deve recorrer-se às normas de desempenho predefinidas para demonstrar a fiabilidade e a exatidão de um novo método antes de ser utilizado para ensaios regulamentares (10).

Interpretação dos resultados e classificação das substâncias químicas em estudo

27. Utiliza-se o tempo (em minutos) decorrido entre a aplicação do produto químico em estudo na membrana e a penetração nesta para classificar o produto em causa em termos das subcategorias de corrosividade do sistema GHS da ONU (1) e, se for caso disso, do grupo de embalagens da ONU (16). Para cada método de ensaio proposto, são estabelecidos valores-limite para cada uma das três subcategorias. As decisões finais sobre tempos-limite devem ter em conta a necessidade de minimizar a subclassificação do perigo de corrosão (ou seja, os falsos negativos). No presente ensaio, devem utilizar-se os tempos-limite do Corrositex®, descritos no quadro 3, uma vez que este constitui o único método de ensaio atualmente abrangido pela *Test Guideline* em vigor (7).

Quadro 3

Modelo de previsão do Corrositex®

Tempo médio de penetração (min)		Previsão do GHS da ONU (3)
Produtos químicos em estudo da categoria (1) (determinados pelo ensaio de classificação do método)	Produtos químicos em estudo da categoria (2) (determinados pelo método de classificação do método)	
0-3 min	0-3 min	Subcategoria facultativa de corrosividade 1A
> 3-60 min	> 3-30 min	Subcategoria facultativa de corrosividade 1B
> 60-240 min	> 30-60 min	Subcategoria facultativa de corrosividade 1C
> 240 min	> 60 min	Não corrosivo

(1) Produtos químicos em estudo com reserva ácida/alcalina elevada (6).
(2) Produtos químicos em estudo com uma reserva ácida/alcalina baixa (6).
(3) As subcategorias 1A, 1B e 1C do GHS da ONU correspondem aos grupos de embalagem I, II e III.

▼**M8**

DADOS E RELATÓRIOS

Dados

28. O tempo (em minutos) decorrido entre a aplicação e a penetração da barreira pelo produto químico em estudo e pelo(s) controlo(s)positivo(s) deve ser indicado num quadro que inclua os dados correspondentes a cada replicado, bem como o desvio-padrão aproximado para cada ensaio.

Relatório de ensaio

29. O relatório de ensaio deve conter as seguintes informações:

Produto químico em estudo e substâncias de controlo:

— Substância monocomponente: dados de identificação química, como as denominações IUPAC ou CAS, número CAS, código SMILES ou InChI, fórmula estrutural, pureza, identidade química das impurezas, caso se justifique e seja exequível, etc.;

— Substância multicomponentes, UVCB e mistura: caracterizada, na medida do possível, pela identidade química (ver acima), ocorrência quantitativa e principais propriedades físico-químicas dos componentes;

— Aspeto físico, solubilidade em água e outras propriedades físico-químicas pertinentes;

— Proveniência, número do lote, se disponíveis;

— Tratamento do produto químico em estudo/substância de controlo antes do ensaio, se for o caso;

— Estabilidade do produto químico em estudo, data-limite de utilização ou data de reanálise, se conhecidas.

— Condições de armazenagem.

Veículo:

— Identificação, concentração (se pertinente), volume utilizado;

— Justificação do excipiente escolhido.

Modelo de membrana de estanquidade in vitro *e protocolo utilizado, incluindo a exatidão e fiabilidade demonstradas*

Condições de realização do ensaio:

— Descrição da montagem e dos processos de preparação utilizados;

— Origem e composição da membrana de estanquidade *in vitro*;

— Composição e propriedades da solução do indicador;

— Método de deteção;

— Quantidades do produto químico em estudo e da substância de controlo;

— Número de replicados;

— Descrição e justificação do ensaio de classificação temporal realizado;

▼M8

— Método de aplicação;

— Tempos de observação;

— Descrição dos critérios de avaliação e de classificação aplicados;

— Demonstração da competência na execução do método de ensaio antes da sua utilização regular, através do ensaio das substâncias químicas de demonstração de competência técnica.

Resultados:

— Quadro com os dados brutos obtidos a partir de amostras individuais de ensaio e de controlo, para cada replicado;

— Descrição de outros efeitos observados;

— Classificação atribuída, mencionando o modelo de previsão ou os critérios de decisão utilizados.

Discussão dos resultados

Conclusões

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(1) Nações Unidas (ONU) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Fifth Revised Edition, UN New York and Geneva, 2013. Disponível em: http://www.unece.org/ /trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) Capítulo B.4 deste anexo, «Toxicidade aguda: irritação/corrosão dérmica»

(3) Capítulo B.40.A deste anexo, «Corrosão da pele *in vitro*: Método de ensaio da epiderme humana reconstruída (RHE)».

(4) Capítulo B.40 deste anexo, «Corrosão da pele *in vitro*: Ensaio da resistência elétrica transcutânea (RET)».

(5) OCDE (2015). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment of Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(6) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.-G. and Liebsch, M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. Toxicology *In Vitro* 12, 483-524.

(7) ICCVAM (1999). Corrositex®. An *In Vitro* Test Method for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by ICCVAM, NTP and NICEATM. NIEHS, NIH Publication (No 99-4495.)

(8) Gordon V.C., Harvell J.D. and Maibach H.I. (1994). Dermal Corrosion, the Corrositex® System: A DOT Accepted Method to Predict Corrosivity Potential of Test Materials. *In vitro* Skin Toxicology-Irritation, Phototoxicity, Sensitization. Alternative Methods in Toxicology 10, 37-45.

▼**M8**

(9) OCDE (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications. Series on testing and Assessment (No 34).

(10) OCDE (2014). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion in Relation to TG 435. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Disponível em: http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/PerfStand-TG430-June14.pdf.

(11) ECVAM (2001). Statement on the Application of the CORROSITEX® Assay for Skin Corrosivity Testing. 15th Meeting of ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC), Ispra, Italy. ATLA 29, 96-97.

(12) U.S. DOT (2002). Exemption DOT-E-10904 (Fifth Revision). (September 20, 2002). Washington, D.C., U.S. DOT.

(13) Capítulo B.46 deste anexo, «Corrosão da pele *in vitro*: Método de ensaio em epiderme humana reconstruída». ICCVAM (2004). ICCVAM Recommended Performance Standards for *In Vitro* Test Methods for Skin Corrosion. NIEHS, NIH Publication No 04-4510. Disponível em: http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/dermal_docs/ps/ /ps044510.pdf.

(14) U.S. EPA (1996). Method 1120, Dermal Corrosion. Disponível em: http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/1120.pdf.

(15) Nações Unidas (ONU) (2013). UN Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Model Regulations, 18th Revised Edition (Part, Chapter 2.8), UN, 2013. Disponível em: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/unrec/rev18/English/Rev18_Volume1_Part2.pdf.

▼**M8**

Apêndice

DEFINIÇÕES

Adequação: Relação do método de ensaio com o efeito em causa; pertinência e utilidade do ensaio para o fim em vista. Traduz a medida em que o método de ensaio mede ou prevê corretamente o efeito biológico em causa. A adequação compreende a exatidão (concordância) do método de ensaio (9).

Concordância: Mede o desempenho do método de ensaio no caso dos métodos cujos resultados sejam estabelecidos em função de categorias e constitui um dos aspetos da adequação. Este termo e o termo «exatidão» são muitas vezes utilizados indistintamente para indicar a proporção de produtos químicos testados que são corretamente classificados como positivos ou negativos. A concordância é altamente dependente da prevalência do produto químico em estudo positivo no tipo de produto químico em estudo (9).

Corrosão da pele *in vivo*: Produção de danos irreversíveis à pele, nomeadamente a necrose visível da epiderme, prolongando-se para a derme, após a aplicação de um produto químico em estudo durante um máximo de quatro horas. São exemplos típicos de reações corrosivas as úlceras, hemorragias e escaras sanguinolentas e, no final do período de observação de 14 dias, a descoloração, devido à perda de pigmentação da pele, e a formação de zonas de alopécia total e de cicatrizes. As lesões duvidosas poderão ser elucidadas por métodos histopatológicos.

Especificidade: Proporção dos produtos químicos negativos/inativos que são corretamente classificados pelo método de ensaio. Constitui uma medida da exatidão de um método de ensaio cujos resultados sejam estabelecidos em função de categorias e é um aspeto importante a ter em conta na avaliação da adequação do método em causa (9).

Exatidão: Grau de acordo entre os resultados do método de ensaio e os valores de referência aceites. Constitui uma medida do desempenho do método e um dos aspetos da adequação. Este termo e o termo «concordância» são muitas vezes utilizados indistintamente para indicar a proporção de resultados corretos de um método de ensaio (9).

Fiabilidade: Medida em que, utilizando o mesmo protocolo, um método de ensaio pode ser continuadamente reproduzido no mesmo laboratório e em laboratórios diferentes. A fiabilidade é avaliada com base nos valores calculados das reprodutibilidades intralaboratorial e interlaboratorial (9).

GHS(Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos): Sistema que propõe a classificação dos produtos químicos (substâncias e misturas) em função de tipos e níveis normalizados de perigos físicos, sanitários e ambientais e trata ainda dos correspondentes elementos de comunicação, como pictogramas, palavras-sinal, advertências de perigo, recomendações de prudência e fichas de dados de segurança, de modo a transmitir informações sobre os efeitos indesejáveis do produto em causa, com vista à proteção das pessoas (empregadores, trabalhadores, transportadores, consumidores, pessoal dos serviços de emergência, etc.) e do ambiente (1).

IATA: Abordagem integrada de ensaio e avaliação.

Mistura: Uma mistura ou solução composta por duas ou mais substâncias.

NC: Não corrosivo.

Normas de desempenho: Normas associadas a um método de ensaio validado com base nas quais pode ser avaliada a comparabilidade de um método de ensaio proposto que lhe seja funcional e mecanisticamente similar. Incluem: (i) componentes essenciais do método de ensaio; (ii) uma lista mínima de produtos químicos de referência, escolhidos de entre os produtos químicos utilizados para demonstrar o desempenho aceitável do método de ensaio validado; e (iii) níveis de exatidão e fiabilidade comparáveis, baseados no que foi obtido para o método de ensaio validado, que o método de ensaio proposto deve demonstrar quando avaliado pela utilização da lista mínima de produtos químicos de referência (9).

▼**M8**

Produto químico: uma substância ou mistura.

Produto químico de ensaio: qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado o presente método de ensaio.

Sensibilidade: Proporção dos produtos químicos positivos/ativos que são corretamente classificados pelo método de ensaio. Constitui uma medida da exatidão de um método de ensaio cujos resultados são estabelecidos em função de categorias e é um aspeto importante a ter em conta para avaliar a adequação do método em causa (9).

Sistema de deteção química (CDS): Sistema de medição visual ou eletrónico com uma solução indicadora que reage à presença de um produto químico em estudo, por exemplo, com a alteração do corante, ou combinação de corantes, do indicador de pH que mostre uma alteração da cor em reação à presença do produto químico em estudo ou com outros tipos de reações químicas ou eletroquímicas.

Substância: um elemento químico e os seus compostos no estado natural ou obtido por qualquer processo de produção, incluindo qualquer aditivo necessário para preservar a sua estabilidade e qualquer impureza derivada do processo utilizado, mas excluindo qualquer solvente que possa ser separado sem afetar a estabilidade da substância nem modificar a sua composição.

Substância monocomponente: Substância, definida pela sua composição quantitativa, na qual um dos principais componentes está presente num teor de, pelo menos, 80 % (m/m).

Substância multicomponentes: Substância, definida pela sua composição quantitativa, na qual mais de um dos principais componentes está presente numa concentração $\geq$ 10 % (m/m) e $<$ 80 % (m/m). As substâncias multicomponentes resultam de processos de fabrico. A diferença entre uma mistura e uma substância multicomponentes reside em que a primeira se obtém misturando duas ou mais substâncias, sem reação química. As substâncias multicomponentes resultam de reações químicas.

UVCB: Substâncias de composição desconhecida ou variável, produtos de reação complexos ou materiais biológicos.

▼M8

B.66. ENSAIOS DE TRANSATIVAÇÃO TRANSFETADA COM ESTABILIDADE PARA DETEÇÃO DE RECETORES DE ESTROGÉNIO AGONISTAS E ANTAGONISTAS E ANTAGONISTAS

INTRODUÇÃO GERAL

Método de ensaio baseado na *Test Guideline* da OCDE

1. O presente método de ensaio é equivalente à *Test Guideline* 455 (2016) da OCDE. Esta última é uma diretriz de ensaio baseada no desempenho (PBTG), que descreve a metodologia de ensaios de transativação transfetada *in vitro* para deteção de recetores de estrogénio agonistas e antigonistas (ensaios ER TA). É composto por vários métodos de ensaio, mecânica e funcionalmente afins, para a identificação de recetores de estrogénio (ERα e/ou ERβ) agonistas e antagonistas, e deve facilitar o desenvolvimento de novos métodos de ensaio semelhantes ou modificados de acordo com os princípios de validação estabelecidos no *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment* (1) da OCDE. Os métodos de ensaio de referência inteiramente validados (apêndice 2 e apêndice 3) que constituem a base deste PBTG são os seguintes:

— The Stably Transfected TA (STTA) assay (2) using the (h) ERα-HeLa--9903 cell line; and

— The VM7Luc ER TA assay (3) using the VM7Luc4E2 cell line ([1]) which predominately expresses hERα with some contribution from hERβe(4)(5).

Para o desenvolvimento e a validação de ensaios semelhantes para o mesmo parâmetro de risco, existem normas de desempenho (PS) (6) (7), que importa utilizar. Permitem a alteração atempada do PBTG 455, para que se possam acrescentar novos ensaios semelhantes a um PBTG atualizado. No entanto, só serão adicionados ensaios semelhantes após análise e aprovação pela OCDE do cumprimento das normas de desempenho. Os ensaios incluídos no método TG 455 podem ser utilizados indiscriminadamente para satisfazer as necessidades dos países membros da OCDE relativamente a resultados de ensaios de transativação de recetores de estrogénio, beneficiando simultaneamente da aceitação mútua de dados da OCDE.

Antecedentes e princípios dos ensaios incluídos no presente método

2. A OCDE iniciou em 1998 uma atividade altamente prioritária com o objetivo de rever as diretrizes em vigor para a pesquisa e o ensaio de produtos químicos com possíveis efeitos de perturbação endócrina, bem como elaborar

([1]) Até junho de 2016, esta linha celular designava-se BG1Luc. As células BG-1 foram inicialmente descritas por Geisinger *et al*. (1998) (35) e posteriormente caracterizadas por investigadores do National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) (36). Recentemente, constatou-se a existência de duas variantes das células BG-1 utilizadas pelos investigadores, BG-1 Fr e BG-1 NIEHS. Uma análise aprofundada – incluindo testes de ADN – destas duas linhas celulares BG-1, efetuada por Li *et al*. (2014) (37), revelou que a BG-1 Fr era única e que a BG-1 NIEHS, ou seja, a linha celular original utilizada para desenvolver o ensaio, não era a linha celular BG1 do carcinoma ovárico humano, mas sim uma variante da linha celular do cancro da mama humano, MCF7. A linha celular utilizada no ensaio, originalmente conhecida como BG1Luc4E2 (38), passará agora a designar-se VM7Luc4E2 («V» = variante; «M7» = células MCF7). De igual modo, o ensaio passará a designar-se VM7Luc ER TA. Embora mude a origem da linha celular em que se baseia o ensaio, isto não afeta os estudos de validação publicados nem a utilidade e aplicação deste ensaio para rastreio de produtos químicos estrogénios/anti-estrogénios.

▼**M8**

novas diretrizes. O quadro concetual da OCDE para ensaio e avaliação de produtos químicos potencialmente perturbadores do sistema endócrino do sistema endócrino foi revisto em 2012. Os quadros concetuais original e revisto constam, como anexo, do *Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption* da OCDE (8). O quadro concetual contém cinco níveis, cada um dos quais corresponde a um nível diferente de complexidade biológica. O ensaio de transativação de ER (TA) descrito no presente método de ensaio é do nível 2, que abrange os ensaios *in vitro* que facultam dados sobre mecanismos/vias endócrinos selecionados. O método destina-se a ensaios de transativação (TA) *in vitro*, concebidos para identificar recetores de estrogénio (RE) agonistas e antagonistas.

3. A interação dos estrogénios com os RE pode afetar a transcrição de genes estrogénicos, que podem conduzir à indução ou inibição de processos celulares, incluindo os necessários para a proliferação celular, para o desenvolvimento fetal normal e para a função reprodutora (9) (10) (11). A perturbação de sistemas estrogénicos normais pode provocar efeitos nocivos no desenvolvimento normal (ontogénese), na saúde reprodutiva e na integridade do aparelho reprodutor.

4. Os ensaios de TA *in vitro* baseiam-se numa interação direta ou indireta das substâncias com um recetor específico que regula a transcrição de um produto de gene repórter. Estes ensaios foram amplamente utilizados para avaliar a expressão dos genes regulados por recetores nucleares específicos, como os ER (12) (13) (14) (15) (16). Foram propostos para deteção da transativação estrogénica regulada pelo ER (17) (18) (19). Há, pelo menos, dois grandes subtipos de RE nucleares, α e β, que são codificados por genes distintos. As proteínas respetivas têm funções biológicas diferentes, bem como distribuições de tecidos e afinidades com ligandos diferentes (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26). O ERα nuclear determina a reação estrogénica clássica (27) (28) (29) (30), pelo que a maioria dos modelos atualmente em desenvolvimento para medir a ativação ou a inibição dos ER são específicos do ERα. Os ensaios são utilizados para identificar produtos químicos que ativem (ou inibam) o ER na sequência de ligações de ligandos, após os quais o complexo recetor-ligando se liga a elementos de resposta de ADN específicos e transativa um gene repórter, que provoca o aumento da expressão celular de um marcador proteico. Nestes ensaios podem ser utilizadas diferentes respostas do repórter. Em sistemas à base de luciferase, a enzima luciferase transforma o substrato de luciferina num produto bioluminescente que pode ser medido quantitativamente com um luminómetro. Outros exemplos de repórteres comuns são a proteína fluorescente e o gene *lacZ*, que codificam a β-galactosidase, uma enzima que pode transformar o substrato incolor X-Gal (5-bromo-4-cloro-indolil-galactopiranosídeo azul) num produto quantificável com um espectrofotómetro. Estes repórteres podem ser avaliados de forma rápida e pouco onerosa com os conjuntos de ensaio existentes no mercado.

5. Os estudos de validação do STTA e dos ensaios VM7Luc demonstraram a sua adequação e fiabilidade para o fim a que se destinam (3) (4) (5) (30). As normas de desempenho para ensaios ER TA baseados na luminescência com linhas celulares mamárias constam do *ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An* In Vitro *Assay for Identifying Human Estrogen Recetor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals* (3). Estas normas de desempenho foram alteradas para serem aplicáveis tanto aos ensaios STTA como aos ensaios VM7Luc (2).

6. As definições e abreviaturas utilizadas no presente método de ensaio são descritas no apêndice 1.

▼M8

Âmbito e limitações relacionados com os ensaios de TA

7. Os ensaios são propostos para efeitos de rastreio e de definição de prioridades, mas podem também fornecer informações mecanísticas passíveis de serem utilizadas numa abordagem de ponderação da suficiência da prova. Centram-se na TA induzida por um produto químico que se liga ao ER num sistema *in vitro*. Assim, os resultados não devem ser extrapolados diretamente para o complexo de sinalização e regulação do sistema endócrino intacto *in vivo*.

8. A TA mediada pelos ER é considerada um dos principais mecanismos de desregulação endócrina, embora existam outros mecanismos através dos quais o ED pode ocorrer, incluindo (i) interações com outros recetores e sistemas enzimáticos no sistema endócrino, (ii) síntese das hormonas, (iii) ativação e/ou inativação metabólica de hormonas, (iv) distribuição de hormonas por tecidos-alvo e (v) eliminação de hormonas do organismo. Nenhum dos ensaios no âmbito do presente método aborda estes modos de ação.

9. O presente método de ensaio incide na capacidade dos produtos químicos de ativarem (ou seja, agirem como agonistas) e eliminarem (ou seja, agirem como antagonistas) a transcrição dependente do ER. Alguns produtos químicos podem, em função do tipo de células, apresentar atividades de agonista e antagonista, sendo conhecidos como moduladores seletivos de recetores de estrogénio (SERMS). Os produtos químicos que são negativos nestes ensaios podem ser avaliados num ensaio de ligação de ER antes de se concluir que não se ligam ao recetor. Além disso, os ensaios só são suscetíveis de informar sobre a atividade da molécula-mãe tendo em conta a limitada capacidade de metabolização dos sistemas de células *in vitro*. Considerando que, na validação, apenas foram utilizadas substâncias estremes, a aplicabilidade a misturas de ensaio não foi tida em conta. No entanto, o método é teoricamente aplicável ao ensaio de substâncias multicomponentes, UVCB e misturas. Antes da sua aplicação a uma substância multicomponentes, UVCB ou mistura para obter dados com uma finalidade normativa, deve ponderar-se se e, em caso afirmativo, por que razão o método pode proporcionar resultados adequados para o efeito. Essas considerações não são necessárias se existir um requisito normativo para o ensaio da mistura.

10. Para efeitos informativos, o quadro 1 fornece os resultados do ensaio de agonistas para as 34 substâncias que foram ensaiadas com ambos os métodos de ensaio de referência plenamente validados descritos no presente. Destas substâncias, 26 são classificadas como ER agonistas e 8 negativas, com base em relatórios publicados, incluindo ensaios *in vitro* de ligação de ER e TA e/ou o ensaio uterotrófico (2) (3) (18) (31) (32) (33) (34). O quadro 2 fornece os resultados do ensaio de antagonistas relativos às 15 substâncias ensaiadas em ambos os métodos de ensaio de referência plenamente validados descritos no presente método de ensaio. Entre estas substâncias, 4 são classificadas como antagonistas ER definitivas/presumidas e 10 negativas, com base em relatórios publicados, incluindo os ensaios *in vitro* de ligação ER e TA (2) (3) (18) (31). Relativamente aos dados resumidos nos quadros 1 e 2, houve concordância total entre os dois métodos de ensaio de referência para as classificações de todas as substâncias, com exceção de uma (mifepristona) para o ensaio antagonista, e cada substância foi classificada corretamente como agonista/antagonista de ER ou negativa. Constam das normas de desempenho para o AETR (6) (7), apêndice 2 (quadros 1, 2 e 3), informações suplementares sobre este grupo de produtos químicos, assim como ensaios de produtos químicos adicionais no STTA e no VM7Luc ER TA realizados durante os estudos de validação.

▼M8

Quadro 1

Panorâmica dos resultados de ensaios STTA e VM7Luc ER TA para substâncias ensaiadas em ambos os ensaios agonistas e classificadas como ER agonistas (POS) ou negativas (NEG

	Substância	N.º CAS	Ensaio STTA (1)			Ensaio VM7Luc ER TA (2)		Fonte de dados para classificação (4)		
			ER TA Atividade	Valor PC_{10} (M)	Valor PC_{50} (b) (M)	Atividade ER TA	Valor EC_{50} (b), (3) (M)	Outros ER TAs (c)	ER Ligante	Uterotrófico
1	17ß-Estradiol (a)	50-28-2	POS	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	POS	$5{,}63 \times 10^{-12}$	POS (227/227)	POS	POS
2	17α-Estradiol (a)	57-91-0	POS	$7{,}24 \times 10^{-11}$	$6{,}44 \times 10^{-10}$	POS	$1{,}40 \times 10^{-9}$	POS(11/11)	POS	POS
3	17α-Etinilestradiol (a)	57-63-6	POS	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	POS	$7{,}31 \times 10^{-12}$	POS(22/22)	POS	POS
4	17β-Trembolona	10161-33-8	POS	$1{,}78 \times 10^{-8}$	$2{,}73 \times 10^{-7}$	POS	$4{,}20 \times 10^{-8}$	POS (2/2)	NT	NT
5	19-Nortestosteron (a)	434-22-0	POS	$9{,}64 \times 10^{-9}$	$2{,}71 \times 10^{-7}$	POS	$1{,}80 \times 10^{-6}$	POS(4/4)	POS	POS
6	4-Cumilfenol (a)	599-64-4	POS	$1{,}49 \times 10^{-7}$	$1{,}60 \times 10^{-6}$	POS	$3{,}20 \times 10^{-7}$	POS(5/5)	POS	NT
7	4-*terc*-Octilfenol (a)	140-66-9	POS	$1{,}85 \times 10^{-9}$	$7{,}37 \times 10^{-8}$	POS	$3{,}19 \times 10^{-8}$	POS(21/24)	POS	POS
8	Apigenin (a)	520-36-5	POS	$1{,}31 \times 10^{-7}$	$5{,}71 \times 10^{-7}$	POS	$1{,}60 \times 10^{-6}$	POS(26/26)	POS	NT
9	Atrazin (a)	1912-24-9	NEG.	—	—	NEG.	—	NEG (30/30)	NEG.	NT
10	Bisfenol A (a)	80-05-7	POS	$2{,}02 \times 10^{-8}$	$2{,}94 \times 10^{-7}$	POS	$5{,}33 \times 10^{-7}$	POS (65/65)	POS	POS
11	Bisfenol B (a)	77-40-7	POS	$2{,}36 \times 10^{-8}$	$2{,}11 \times 10^{-7}$	POS	$1{,}95 \times 10^{-7}$	POS(6/6)	POS	POS
12	Ftalato de benzilo e butilo (a)	85-68-7	POS	$1{,}14 \times 10^{-6}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	POS	$1{,}98 \times 10^{-6}$	POS(12/14)	POS	NEG.

▼M8

	Substância	N.º CAS	Ensaio STTA [1]			Ensaio VM7Luc ER TA [2]		Fonte de dados para classificação [4]		
			ER TA Atividade	Valor PC_{10} (M)	Valor PC_{50} [b] (M)	Atividade ER TA	Valor EC_{50} [b], [3] (M)	Outros ER TAs [c]	ER Ligante	Uterotrófico
13	Corticosteron [a]	50-22-6	NEG.	—	—	NEG.	—	NEG (6/6)	NEG.	NT
14	Cumesterol [a]	479-13-0	POS	$1{,}23 \times 10^{-9}$	$2{,}00 \times 10^{-8}$	POS	$1{,}32 \times 10^{-7}$	POS(30/30)	POS	NT
15	Daidzeín [a]	486-66-8	POS	$1{,}76 \times 10^{-8}$	$1{,}51 \times 10^{-7}$	POS	$7{,}95 \times 10^{-7}$	POS(39/39)	POS	POS
16	Dietilestilbesterol [a]	56-53-1	POS	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}04 \times 10^{-11}$	POS	$3{,}34 \times 10^{-11}$	POS(42/42)	POS	NT
17	Ftalato de di-*n*-butilo	84-74-2	POS	$4{,}09 \times 10^{-6}$		POS	$4{,}09 \times 10^{-6}$	POS(6/11)	POS	NEG.
18	Etilparabeno	120-47-8	POS	$5{,}00 \times 10^{-6}$	(no PC_{50})	POS	$2{,}48 \times 10^{-5}$	POS		NT
19	Estron [a]	53-16-7	POS	$3{,}02 \times 10^{-11}$	$5{,}88 \times 10^{-10}$	POS	$2{,}34 \times 10^{-10}$	POS(26/28)	POS	POS
20	Genisteín [a]	446-72-0	POS	$2{,}24 \times 10^{-9}$	$2{,}45 \times 10^{-8}$	POS	$2{,}71 \times 10^{-7}$	POS(100/102)	POS	POS
21	Haloperidol	52-86-8	NEG.	—	—	NEG.	—	NEG (2/2)	NEG.	NT
22	Campferol [a]	520-18-3	POS	$1{,}36 \times 10^{-7}$	$1{,}21 \times 10^{-6}$	POS	$3{,}99 \times 10^{-6}$	POS(23/23)	POS	NT
23	Clordecon [a]	143-50-0	POS	$7{,}11 \times 10^{-7}$	$7{,}68 \times 10^{-6}$	POS	$4{,}91 \times 10^{-7}$	POS(14/18)	POS	NT
24	Cetoconazol	65277-42-1	NEG.	—	—	NEG.	—	NEG (2/2)	NEG.	NT
25	Linurão [a]	330-55-2	NEG.	—	—	NEG.	—	NEG (8/8)	NEG.	NT
26	*meso*-Hexesterol [a]	84-16-2	POS	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}75 \times 10^{-11}$	POS	$1{,}65 \times 10^{-11}$	POS(4/4)	POS	NT
27	Metiltestosteron [a]	58-18-4	POS	$1{,}73 \times 10^{-7}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	POS	$2{,}68 \times 10^{-6}$	POS(5/6)	POS	NT

▼M8

	Substância	N.º CAS	Ensaio STTA (1)			Ensaio VM7Luc ER TA (2)		Fonte de dados para classificação (4)		
			ER TA Atividade	Valor PC_{10} (M)	Valor PC_{50} (b) (M)	Atividade ER TA	Valor EC_{50} (b), (3) (M)	Outros ER TAs (c)	ER Ligante	Uterotrófico
28	Morina	480-16-0	POS	$5{,}43 \times 10^{-7}$	$4{,}16 \times 10^{-6}$	POS	$2{,}37 \times 10^{-6}$	POS(2/2)	POS	NT
29	Noretinodrel (a)	68-23-5	POS	$1{,}11 \times 10^{-11}$	$1{,}50 \times 10^{-9}$	POS	$9{,}39 \times 10^{-10}$	POS(5/5)	POS	NT
30	*p,p'*-Metoxicloro (a)	72-43-5	POS	$1{,}23 \times 10^{-6}$	(no PC_{50}) (a)	POS	$1{,}92 \times 10^{-6}$	POS(24/27)	POS	POS
31	Fenobarbital (a)	57-30-7	NEG.	—	—	NEG.	—	NEG (2/2)	NEG.	NT
32	Reserpina	50-55-5	NEG.	—	—	NEG.	—	NEG (4/4)	NEG.	NT
33	Espironolacton (a)	52-01-7	NEG.	—	—	NEG.	—	NEG (4/4)	NEG.	NT
34	Testosterona	58-22-0	POS	$2{,}82 \times 10^{-8}$	$9{,}78 \times 10^{-6}$	POS	$1{,}75 \times 10^{-5}$	POS(5/10)	POS	NT

Abreviaturas: N.º CAS = Número de registo do Chemical Abstracts Service; M = molar; EC_{50} = Concentração semimáxima eficaz de um produto químico em estudo; NEG = negativo; POS= positivo; NT = não ensaiado; PC_{10} (e PC_{50}) = concentração um produto químico em estudo em que a resposta é 10 % (ou 50 % para PC_{50}) da resposta induzida pelo controlo positivo (E2, 1nM) em cada placa.

(a) Substâncias comuns submetidas aos ensaios STTA e VM7Luc ER TA, designadas como ER agonistas ou negativas e utilizadas para avaliar a exatidão no estudo de validação do VM7Luc ER TA [ICCVAM VM7Luc ER TA Evaluation Report, quadro 4-1 (3)].

(b) A concentração máxima ensaiada na ausência de limitações devidas à citotoxicidade ou à insolubilidade foi de 1×10^{-5} M (ensaio STTA) e de 1×10^{-3} M (ensaio VM7Luc ER TA).

(c) O número entre parêntesis representa os resultados classificados como positivos (POS) ou negativos (NEG) em relação ao número total de estudos referenciados.

(1) Valores indicados no *Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity - The Human Estrogen Recetor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line* (2)

(2) *ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An* In Vitro *Method for Identifying ER Agonists and Antagonists* (3)

(3) Foram calculados valores médios de EC_{50} com os valores comunicados pelos laboratórios do estudo de validação do VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM e Hiyoshi) (3).

(4) A classificação como agonista do ER ou negativa baseou-se em informações constantes dos *Background Review Documents* (BRD) relativos aos métodos de ensaio do ligante do ER e de TA do ICCVAM (31), bem como em informações obtidas a partir de publicações e analisadas após a conclusão dos BRD do ICCVAM (2) (3) (18) (31) (33) (34).

Notas: Nem todos os ensaios no âmbito do presente método recorrem às mesmas medições. Em alguns casos, o EC_{50} não pode ser calculado porque não é gerada uma curva completa de resposta às doses. Embora com o ensaio STTA o valor PC_{10} seja uma medição fundamental, pode haver outros exemplos em que um valor PCx fornece informações úteis.

▼M8

Quadro 2

Comparação dos resultados dos ensaios SSTTA e VM7Luc ER TA para substâncias ensaiadas em ambos os ensaios agonistas e classificadas como ER antagonistas (POS) ou negativas (NEG)

	Substância [a]	N.º CAS	Ensaio ER STTA [2]		Ensaio VM7Luc ER TA [3]		Efeitos candidatos ER STTA [5]	Classificação consensual do ICCVAM [6] Classe de produtos químicos	MeSH [7]	Classe de produtos [8]
			Atividade ER TA	Valor IC_{50} [1] (M)	Atividade ER TA	Valor IC_{50} [1], [4] (M)				
1	4-Hidroxitamoxifeno	68047-06-3	POS	$3{,}97 \times 10^{-9}$	POS	$2{,}08 \times 10^{-7}$	POS moderado	POS	Hidrocarboneto cíclico	Produtos farmacêuticos
2	Dibenzo[a.h]antraceno	53-70-3	POS	N.º IC_{50}	POS	N.º IC_{50}	POS	PP	Composto policíclico	Produto químico de laboratório, produto natural
3	Mifepristona	84371-65-3	POS	$5{,}61 \times 10^{-6}$	NEG.	—	POS moderado	NEG.	Esteroide	Produtos farmacêuticos
4	Raloxifeno-HCl	82640-04-8	POS	$7{,}86 \times 10^{-10}$	POS	$1{,}19 \times 10^{-9}$	POS moderado	POS	Hidrocarboneto cíclico	Produtos farmacêuticos
5	Tamoxifeno	10540-29-1	POS	$4{,}91 \times 10^{-7}$	POS	$8{,}17 \times 10^{-7}$	POS	POS	Hidrocarboneto cíclico	Produto farmacêutico
6	17β-Estradiol	50-28-2	NEG.	—	NEG.	—	PN	PN	Esteroide	Produto farmacêutico, agente veterinário

▼M8

	Substância (a)	N.º CAS	Ensaio ER STTA (2)		Ensaio VM7Luc ER TA (3)		Efeitos candidatos ER STTA (5)	Classificação consensual do ICCVAM (6) Classe de produtos químicos	MeSH (7)	Classe de produtos (8)
			Atividade ER TA	Valor IC_{50} (1) (M)	Atividade ER TA	Valor IC_{50} (1), (4) (M)				
7	Apigenina	520-36-5	NEG.	—	NEG.	—	NEG.	NEG.	Composto heterocíclico	Corante, produto natural, produto farmacêutico intermédio
8	Atrazina	1912-24-9	NEG.	—	NEG.	—	NEG.	PN	Composto heterocíclico	Herbicida
9	Ftalato de di-*n*-butilo	84-74-2	NEG.	—	NEG.	—	NEG.	NEG.	Éster de ácido ftálico	Ingrediente cosmético, produto químico industrial, plastificante
10	Fenarimol	60168-88-9	NEG.	—	NEG.	—	não ensaiado	PN	Composto heterocíclico, pirimidina	Fungicida
11	Flavona	525-82-6	NEG.	—	NEG.	—	PN	PN	Flavonoide, composto heterocíclico	Produto natural, produto farmacêutico
12	Flutamida	13311-84-7	NEG.	—	NEG.	—	NEG.	PN	Amida	Produto farmacêutico, agente veterinário
13	Genisteína	446-72-0	NEG.	—	NEG.	—	PN	NEG.	Flavonoide, composto heterocíclico	Produto natural, produto farmacêutico

▼M8

	Substância ([a])	N.º CAS	Ensaio ER STTA ([2])		Ensaio VM7Luc ER TA ([3])		Efeitos candidatos ER STTA ([5])	Classificação consensual do ICCVAM ([6]) Classe de produtos químicos	MeSH ([7])	Classe de produtos ([8])
			Atividade ER TA	Valor IC_{50} ([1]) (M)	Atividade ER TA	Valor IC_{50} ([1]), ([4]) (M)				
14	*p-n*-Nonilfenol	104-40-5	NEG.	—	NEG.	—	não ensaiado	NEG.	Fenol	Produto químico intermédio
15	Resveratrol	501-36-0	NEG.	—	NEG.	—	PN	NEG.	Hidrocarboneto cíclico	Produto natural

Abreviaturas: N.º CAS = Número de registo do Chemical Abstracts Service; M = molar; IC_{50} = Concentração semimáxima inibitória de uma substância química em estudo; NEG = negativo; PN = negativo presumível; POS= positivo; PP = presumível positivo.

([a]) Substâncias comuns submetidas aos ensaios STTA e VM7Luc ER TA, designadas como ER agonistas ou negativas e utilizadas para avaliar a exatidão no estudo de validação do VM7Luc ER TA (2) (3).

([b]) A concentração máxima testada na ausência de limitações devidas à citotoxicidade ou à insolubilidade foi 1×10^{-3} M (ensaio STTA) e 1×10^{-5} M (ensaio VM7Luc ER TA).

([1]) *Validation Report of the Stably transfected Transcriptional Activation Assay to Detect ER mediated activity, Part B* (2)

([2]) *ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An* In Vitro *Method for Identifying ER Agonists and Antagonists* (3).

([3]) Foram calculados valores médios de IC_{50} com os valores comunicados pelos laboratórios do estudo de validação do VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM e Hiyoshi) (3).

([4]) Atividade ER STTA estimada a partir de efeitos comunicados constantes dos dados históricos CERI do ensaio de ligação ao recetor ER, do ensaio uterotrófico e de informações recolhidas na literatura publicamente disponível (2)

([5]) A classificação das substâncias como antagonistas do ER ou negativas baseou-se em informações constantes dos *Background Review Documents* (BRD) do ICCVAM (BRD) para os ensaios de ligação ER e TA (31) e em informações obtidas a partir de publicações e análises realizadas após a conclusão dos BRD do ICCVAM (2) (3) (18) (31).

([6]) As substâncias foram afetadas a uma ou várias classes de produtos químicos com recurso a U.S. National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH), uma classificação normalizada e internacionalmente reconhecida (disponível em http://www.nlm.nih.gov/mesh).

([7]) As substâncias foram afetadas a uma ou várias classes químicas com recurso ao U.S. National Library of Medicine's Hazardous Substances Data Bank (disponível em http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HDPB).

▼M8

COMPONENTES DOS ENSAIOS ER TA

Componentes de ensaio essenciais

11. O presente método de ensaio aplica-se aos ensaios que utilizam um recetor ERα transfetado estavelmente ou endógeno e um constituinte de gene repórter transfetado estavelmente sob o controlo de um ou mais elementos de resposta estrogénicos; no entanto, podem estar presentes outros recetores, como o ERβ. Estes são componentes essenciais do ensaio.

Controlos

12. Deve ser descrita a base dos padrões de referência concorrentes propostos para cada ensaio de agonistas e antagonistas. Os controlos paralelos (negativo, solvente e positivo), se necessário, servem como indicação de que o método de ensaio está a funcionar nas condições do ensaio e fornecem uma base para comparações entre experiências; geralmente, são parte dos critérios de aceitabilidade de uma experiência (1).

Procedimentos normalizados de controlo de qualidade

13. Devem ser aplicados os procedimentos normalizados de controlo da qualidade descritos para cada ensaio, a fim de garantir que a linha celular se mantém estável através de passagens múltiplas, continua isenta de micoplasma (isto é, sem contaminação bacteriana) e mantém a capacidade de fornecer as respostas mediadas pelo ER previstas ao longo do tempo. As linhas celulares devem ser sujeitas a um controlo suplementar para verificar se a sua identidade está correta, bem como para identificar outros contaminantes (por exemplo, fungos, leveduras e vírus).

Demonstração da competência técnica do laboratório

14. Antes de ensaiar produtos químicos desconhecidos com qualquer um dos ensaios no âmbito do presente método de ensaio, cada laboratório deve demonstrar a sua competência na utilização do ensaio. Para demonstrar a competência, cada laboratório deve ensaiar as 14 substâncias enumeradas no quadro 3 no que respeita ao ensaio de agonistas e as 10 substâncias do quadro 4 para o ensaio antagonista. Este ensaio de competência deve também confirmar a capacidade de resposta do sistema de ensaio. A lista de substâncias de competência é um subconjunto das substâncias de referência constantes das normas de desempenho para os ensaios ER TA (6). Estas substâncias estão comercialmente disponíveis, representam as classes de produtos químicos normalmente associadas à atividade agonista ou antagonista de ER e apresentam uma gama de potência adequada e esperada para agonistas/antagonistas de ER (ou seja, de fortes a fracos) e incluem negativos. Os ensaios das substâncias de competência devem ser reproduzidos pelo menos duas vezes, em dias diferentes. A competência é demonstrada por uma classificação correta (positiva/negativa) de cada uma das substâncias. O ensaio de competência deve ser repetido por todos os técnicos quando aprendem os ensaios. Em função do tipo de célula, algumas destas substâncias de competência podem comportar-se como SERMS e exibir atividades agonistas e antagonistas. No entanto, as substâncias para a demonstração de competência são classificadas nos quadros 3 e 4 de acordo com a sua atividade predominante conhecida, que deve ser utilizada na avaliação da competência.

15. Para demonstrar o desempenho e para fins de controlo de qualidade, cada laboratório deve elaborar bases de dados históricos agonistas e antagonistas com padrões de referência (p. ex., 17β-estradiol e tamoxifeno), produtos químicos de controlo positivo, negativo e de solvente (p.e., DMSO). Inicialmente, a base de dados deve ser gerada a partir de uma série de, pelo menos, 10 ensaios de agonistas independentes (por ex., 17β-estradiol) e 10 ensaios de antagonistas independentes (por exemplo, tamoxifeno). Os resultados de futuras análises destes padrões de referência e dos controlos de solventes devem ser incluídos para aumentar a base de dados, a fim de garantir a coerência e o desempenho do bioensaio por parte do laboratório ao longo do tempo.

▼M8

Quadro 3

Lista de (14) substâncias para o ensaio de competência do agonistas (1)

Nº (8)	Substância	N.º CAS	Resposta prevista (2)	Ensaio STTA			Ensaio VM7Luc ER TA		Classe de produtos químicos MESH (6)	Classe de produtos (7)
				Valor PC_{10} (M) (3)	Valor PC_{50} (M) (3)	Ensaio Conc. Gama (M)	Valor VM7Luc EC_{50} (M) (4)	Conc. mais elevada na procura de gamas (M) (5)		
14	Dietilestilbesterol	56-53-1	POS	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}04 \times 10^{-11}$	$10^{-14} - 10^{-8}$	$3{,}34 \times 10^{-11}$	$3{,}73 \times 10^{-4}$	Hidrocarboneto cíclico	Agente farmacêutico de uso veterinário
12	17α-Estradiol	57-91-0	POS	$4{,}27 \times 10^{-11}$	$6{,}44 \times 10^{-10}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$1{,}40 \times 10^{-9}$	$3{,}67 \times 10^{-3}$	Esteroide	Produto farmacêutico, agente veterinário
15	*meso*-Hexesterol	84-16-2	POS	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}75 \times 10^{-11}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$1{,}65 \times 10^{-11}$	$3{,}70 \times 10^{-3}$	Hidrocarboneto cíclico, fenol	Produto farmacêutico, agente veterinário
11	4-*terc*-Octilfenol	140-66-9	POS	$1{,}85 \times 10^{-9}$	$7{,}37 \times 10^{-8}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$3{,}19 \times 10^{-8}$	$4{,}85 \times 10^{-3}$	Fenol	Produto químico intermédio
9	Genisteína	446-72-0	POS	$2{,}24 \times 10^{-9}$	$2{,}45 \times 10^{-8}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$2{,}71 \times 10^{-7}$	$3{,}70 \times 10^{-4}$	Flavonoide, composto heterocíclico	Produto natural, produto farmacêutico
6	Bisfenol A	80-05-7	POS	$2{,}02 \times 10^{-8}$	$2{,}94 \times 10^{-7}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$5{,}33 \times 10^{-7}$	$4{,}38 \times 10^{-3}$	Fenol	Produto químico intermédio

▼M8

Nº (8)	Substância	N.º CAS	Resposta prevista (2)	Ensaio STTA			Ensaio VM7Luc ER TA		Classe de produtos químicos MESH (6)	Classe de produtos (7)
				Valor PC_{10} (M) (3)	Valor PC_{50} (M) (3)	Ensaio Conc. Gama (M)	Valor VM7Luc EC_{50} (M) (4)	Conc. mais elevada na procura de gamas (M) (5)		
2	Campferol	520-18-3	POS	$1{,}36 \times 10^{-7}$	$1{,}21 \times 10^{-6}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$3{,}99 \times 10^{-6}$	$3{,}49 \times 10^{-3}$	Flavonoide, composto heterocíclico	Produto natural
3	Ftalato de butilo	85-68-7	POS	$1{,}14 \times 10^{-6}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	$10^{-11} – 10^{-5}$	$1{,}98 \times 10^{-6}$	$3{,}20 \times 10^{-4}$	Ácido carboxílico, éster, ácido ftálico	Plastificante, Produtos Químicos Industriais
4	*p,p*'-Metoxicloro	72-43-5	POS	$1{,}23 \times 10^{-6}$	—	$10^{-11} – 10^{-5}$	$1{,}92 \times 10^{-6}$	$2{,}89 \times 10^{-3}$	Hidrocarboneto halogenado	Pesticida, Agente Veterinário
1	Etilparabeno	120-47-8	POS	$5{,}00 \times 10^{-6}$	—	$10^{-11} – 10^{-5}$	$2{,}48 \times 10^{-5}$	$6{,}02 \times 10^{-3}$	Ácido carboxílico, fenol	Produto farmacêutico, conservante
17	Atrazina	1912-24-9	NEG.	—	—	$10^{-10} – 10^{-4}$	—	$4{,}64 \times 10^{-4}$	Composto heterocíclico	Herbicida
20	Espironolactona	52-01-7	NEG.	—	—	$10^{-11} – 10^{-5}$	—	$2{,}40 \times 10^{-3}$	Lactona, esteroide	Produto farmacêutico
21	Cetoconazol	65277-42-1	NEG.	—	—	$10^{-11} – 10^{-5}$	—	$9{,}41 \times 10^{-5}$	Composto heterocíclico	Produto farmacêutico

▼M8

Nº (8)	Substância	N.º CAS	Resposta prevista (2)	Ensaio STTA			Ensaio VM7Luc ER TA		Classe de produtos químicos MESH (6)	Classe de produtos (7)
				Valor PC_{10} (M) (3)	Valor PC_{50} (M) (3)	Ensaio Conc. Gama (M)	Valor VM7Luc EC_{50} (M) (4)	Conc. mais elevada na procura de gamas (M) (5)		
22	Reserpina	50-55-5	NEG.	—	—	$10^{-11} - 10^{-5}$	—	$1{,}64 \times 10^{-3}$	Composto heterocíclico, indol	Produto farmacêutico, agente veterinário

Abreviaturas: N.º CAS = Número de registo do Chemical Abstracts Service; EC_{50} = Concentração semimáxima eficaz de uma substância química em estudo; NEG = negativo; POS= positivo; PC_{10} (e PC_{50}) = concentração de uma substância de ensaio em que a resposta é 10 % (ou 50 % para PC_{50}) da resposta induzida pelo controlo positivo (E2, 1nM) em cada placa.

(1) A classificação como agonista ou negativa do ER baseou-se em informações constantes do *ICCVAM Background Review Documents (BRD) for ER Binding and TA test methods* (31), bem como em informações obtidas a partir de estudos publicados e analisados após a conclusão dos BRD do CCVAM (2) (3) (18) (33) (34).

(2) Valores indicados no *Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity - The Human Estrogen Recetor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line* (30)

(3) Foram calculados valores médios de EC_{50} com os valores comunicados pelos laboratórios do estudo de validação do VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM e Hiyoshi) (3).

(4) As concentrações comunicadas foram as mais elevadas testadas (telémetro) durante a validação do ensaio VM7Luc ER TA Se as concentrações diferirem entre os laboratórios, deve ser comunicada a concentração mais elevada. Ver quadros 3-10 *do Test Method Evaluation Report do ICCVAM;Método de ensaio LUMI-Cell®ER (VM7Luc ER TA): An* In Vitro *Assay for Identifying Human Estrogen Recetor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals* (3).

(5) As substâncias foram afetadas a uma ou várias classes de produtos químicos com recurso à U.S. National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH), uma classificação normalizada e internacionalmente reconhecida (disponível em: http://www.nlm.nih.gov/mesh).

(6) As substâncias foram afetadas a uma ou várias classes químicas com recurso à U.S. National Library of Medicine's Hazardous Substances Database (disponível em: http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB).

(7) A partir do quadro 1 [lista de 22 produtos químicos de referência (22) para avaliação da exatidão das normas de desempenho do agonista ER] (6)

(8) Se uma substância de competência deixar de estar comercialmente disponível, pode utilizar-se uma substância com a mesma classificação e potência, modo de ação e classe de produtos químicos comparáveis.

▼M8

Quadro 4

Lista de (10) substâncias para o ensaio de competência de antagonistas

	Substância [a]	N.º CAS	Ensaio ER STTA [1]			Ensaio VM7Luc ER TA [2]			Efeitos candidatos ER STTA [1]	CCVAM [5] Consensus Classification Classe de produtos químicos	MeSH [6]	Classe de produtos [7]
			Atividade ER TA	IC_{50} (M)	Gama de concentrações de ensaio (M)	Atividade ER TA	IC_{50} [3] (M)	Conc. mais elevada na procura de gamas (M) [4]				
1	4-Hidroxioxita-moxifeno	68047-06-3	POS	$3{,}97 \times 10^{-9}$	$10^{-12} – 10^{-7}$	POS	$2{,}08 \times 10^{-7}$	$2{,}58 \times 10^{-4}$	POS moderado	POS	Hidrocarboneto cíclico	Produto farmacêutico
2	Raloxifeno-HCl	82640-04-8	POS	$7{,}86 \times 10^{-10}$	$10^{-12} – 10^{-7}$	POS	$1{,}19 \times 10^{-9}$	$1{,}96 \times 10^{-4}$	POS moderado	POS	Hidrocarboneto cíclico	Produto farmacêutico
3	Tamoxifeno	10540-29-1	POS	$4{,}91 \times 10^{-7}$	$10^{-10} – 10^{-5}$	POS	$8{,}17 \times 10^{-7}$	$2{,}69 \times 10^{-4}$	POS	POS	Hidrocarboneto cíclico	Produto farmacêutico
4	17β-Estradiol	50-28-2	NEG.	—	$10^{-9} – 10^{-4}$	NEG.	—	$3{,}67 \times 10^{-3}$	para ser negativa (*)	PN	Esteroide	Produto farmacêutico, agente veterinário
5	Apigenina	520-36-5	NEG.	—	$10^{-9} – 10^{-4}$	NEG.	—	$3{,}70 \times 10^{-4}$	NEG.	NEG.	Composto heterocíclico	Corante, produto natural, produto farmacêutico intermédio
6	Ftalato de di-*n*-butilo	84-74-2	NEG.	—	$10^{-8} – 10^{-3}$	NEG.	—	$3{,}59 \times 10^{-3}$	NEG.	NEG.	Éster, ácido ftálico	Ingrediente cosmético, produto químico industrial, plastificante

▼M8

	Substância [a]	N.º CAS	Ensaio ER STTA [1]			Ensaio VM7Luc ER TA [2]			Efeitos candidatos ER STTA [1]	CCVAM [5] Consensus Classification Classe de produtos químicos	MeSH [6]	Classe de produtos [7]
			Atividade ER TA	IC_{50} (M)	Gama de concentrações de ensaio (M)	Atividade ER TA	IC_{50} [3] (M)	Conc. mais elevada na procura de gamas (M) [4]				
7	Flavona	525-82-6	NEG.	—	$10^{-8} – 10^{-3}$	NEG.	—	$4{,}50 \times 10^{-4}$	para ser negativa (*)	PN	Flavonoide, composto heterocíclico	Produto natural, produto farmacêutico
8	Genisteína	446-72-0	NEG.	—	$10^{-9} – 10^{-4}$	NEG.	—	$3{,}70 \times 10^{-4}$	para ser negativa (*)	NEG.	Flavonoide, composto heterocíclico	Produto natural, produto farmacêutico
9	*p-n*-Nonilfenol	104-40-5	NEG.	—	$10^{-9} – 10^{-4}$	NEG.	—	$4{,}54 \times 10^{-4}$	não ensaiado	NEG.	Fenol	Produto químico intermédio
10	Resveratrol	501-36-0	NEG.	—	$10^{-8} – 10^{-3}$	NEG.	—	$4{,}38 \times 10^{-4}$	para ser negativa (*)	NEG.	Hidrocarboneto cíclico	Produto natural

Abreviaturas: N.º CAS = Número de registo do Chemical Abstracts Service; M = molar; IC_{50} = Concentração semimáxima inibitória de uma substância química em estudo; NEG = negativo; PN = negativo presumível; POS= positivo;

(*) classificada negativa de acordo com actividades de acordo com estudos publicados (2)

([a]) Substâncias comuns submetidas aos ensaios STTA e VM7Luc ER TA, designadas ER agonistas ou negativas e utilizadas para avaliar a exatidão no estudo de validação do VM7Luc ER TA (2) (3).

([1]) *Validation Report of the Stably transfected Transcriptional Activation Assay to Detect ER mediated activity, Part B* (2)

([2]) *ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An* In Vitro *Method for Identifying ER Agonists and Antagonists* (3).

([3]) Foram calculados valores médios de IC_{50} com os valores comunicados pelos laboratórios do estudo de validação do VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM e Hiyoshi) (3).

([4]) As concentrações comunicadas foram as mais elevadas testadas (telémetro) durante a validação do ensaio VM7Luc ER TA Se as concentrações diferirem entre os laboratórios, deve ser comunicada a concentração mais elevada. Ver quadros 3-11 do *Test Method Evaluation Report do ICCVAM*; Método de ensaio LUMI-Cell®ER (VM7Luc ER TA): *An* In Vitro *Assay for Identifying Human Estrogen Recetor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals* (3).

([5]) A classificação como antagonista do ER ou negativa baseou-se em informações constantes do ICCVAM Background Review Documents (BRD) for ER Binding and TA test methods (31), bem como em informações obtidas a partir de publicações e analisadas após a conclusão dos BRD do CCVAM (2) (3) (18) (31).

([6]) As substâncias foram afetadas a uma ou várias classes de produtos químicos com recurso ao U.S. National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH), uma classificação normalizada e internacionalmente reconhecida (disponível em http://www.nlm.nih.gov/mesh).

([7]) As substâncias foram afetadas a uma ou várias classes químicas com recurso ao U.S. National Library of Medicine's Hazardous Substances Data Bank (disponível em http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HDPB).

▼M8

Critérios de aceitabilidade dos ensaios

16. A aceitação ou rejeição de uma série de ensaios baseia-se na avaliação dos resultados obtidos para os padrões de referência e dos controlos utilizados para cada experiência. Os valores para PC_{50} (EC_{50}) ou IC_{50} (padrões de referência) devem satisfazer os critérios de aceitabilidade previstos para o ensaio selecionado (para STTA ver apêndice 2, para VM7Luc ER TA ver apêndice 3), e todos os controlos positivos/negativos devem ser corretamente classificados para cada experiência aceite. A capacidade de efetuar o ensaio de forma consistente deve ser demonstrada através da criação e da manutenção de uma base de dados histórica das normas e controlos de referência (ver ponto 15). Os desvios-padrão (desvio-padrão) ou os coeficientes de variação (CV) das médias dos padrões de referência para os parâmetros das curvas de várias experiências podem ser utilizados como indicadores da reprodutibilidade interna do laboratório. Além disso, devem cumprir-se os seguintes princípios relativos aos critérios de aceitabilidade:

— Os dados devem ser suficientes para efetuar uma avaliação quantitativa da ativação ER (ensaio de agonistas) ou supressão (ensaio antagonistas) (isto é, eficácia e potência).

— A atividade média do repórter para a concentração dos estrogénios de referência deve ser, pelo menos, a mínima especificada nos ensaios relativamente ao controlo do veículo (solvente), a fim de garantir a devida sensibilidade. Para os ensaios STTA e VM7Luc ER, esta é quatro vezes a da média do controlo do veículo (solvente) de cada placa.

— As concentrações ensaiadas devem manter-se no intervalo de solubilidade dos produtos químicos em estudo e não demonstrar citotoxicidade.

Análise dos dados

17. O procedimento de interpretação dos dados definido para cada ensaio deve ser utilizado para classificar uma resposta positiva e negativa.

18. O cumprimento dos critérios de aceitação (ponto 16) indica que o ensaio está a funcionar corretamente, mas não assegura que um determinado ensaio específico produza dados exatos. A replicação dos resultados da primeira série de ensaios é a melhor indicação de que foram produzidos dados exatos. Se duas séries de ensaios derem resultados reprodutíveis (por exemplo, os resultados dos dois ensaios indicarem que um produto químico em estudo é positivo), não é necessário realizar uma terceira série de ensaios.

19. Se duas séries de ensaios não permitirem obter resultados reprodutíveis (por exemplo, um produto químico em estudo der positivo numa série e negativo na outra) ou se for necessário um grau de certeza mais elevado quanto ao resultado deste ensaio, devem realizar-se pelo menos três séries de ensaios independentes. Neste caso, a classificação baseia-se em dois resultados concordantes em três.

Critérios gerais para a interpretação dos dados

20. Não existe atualmente um método universalmente aceite para a interpretação dos dados ER TA. No entanto, a avaliação qualitativa (por exemplo positivo/ /negativo) e/ou quantitativa (p. ex., EC_{50}, PC_{50}, IC_{50}) da atividade mediada pelo ER deve basear-se em dados empíricos e em pareceres científicos sólidos. Sempre que possível, os resultados positivos devem ser caracterizados pela magnitude do efeito em comparação com o do controlo do veículo (solvente) ou do estrogénio de referência, bem como pela concentração a que o efeito se produz (por exemplo, EC_{50}, PC_{50}, $RPC_{máx}$, IC_{50}, etc.).

▼M8

Relatório de ensaio

21. O relatório de ensaio deve conter as seguintes informações:

Método de ensaio:

— Método de ensaio utilizado;

— Padrões de controlo/referência/produto químico em estudo

— Origem, número de lote e data-limite de utilização, se conhecida

— Estabilidade do produto químico em estudo, se conhecida;

— Solubilidade e estabilidade do produto químico em estudo no solvente, se conhecida;

— Medição do pH, da pressão osmótica e da quantidade de precipitado no meio de cultura ao qual foi adicionado o produto químico em estudo, consoante o que for adequado.

Substância monocomponente:

— Aspeto físico, hidrossolubilidade e outras propriedades físico-químicas pertinentes;

— Dados de identificação química, como as denominações IUPAC ou CAS, número CAS, código SMILES ou InChI, fórmula estrutural, pureza, identidade química das impurezas, se justificado e exequível, etc.

Substância multicomponentes, UVCB e misturas:

— Caracterizada, na medida do possível, pela identidade química (ver acima), ocorrência quantitativa e principais propriedades físico-químicas dos componentes.

Solvente/veículo:

— Caracterização (natureza, fornecedor e lote);

— Justificação para a escolha do solvente/veículo;

— Solubilidade e estabilidade do produto químico em estudo no solvente/ /veículo, se conhecida.

Células:

— Tipo e origem das células:

  • É o ER expresso endogenamente? Na negativa, que recetor(es) foi/foram transfetado(s)?

  • Constituinte(s) do(s) repórter(es) utilizado(s) (incluindo as espécies de origem);

  • Método de transfeção;

  • Método de seleção para a manutenção da estabilidade da transfeção (quando aplicável);

  • O método de transfeção é relevante para linhas estáveis?

— Número de passagens celulares (desde a descongelação);

▼**M8**

— Número de passagens celulares aquando da descongelação;

— Métodos de manutenção das culturas celulares.

Condições de realização do ensaio:

— Limitações da solubilidade;

— Descrição dos métodos de avaliação da viabilidade aplicados;

— Composição dos meios, concentração de CO_2;

— Concentrações do produto químico em estudo;

— Volumes adicionados do veículo e produto químico em estudo;

— Temperatura e humidade de incubação;

— Duração do tratamento;

— Densidade celular no início e no decurso do tratamento;

— Padrões de referência positivos e negativos;

— Reagentes do repórter (nome do produto, fornecedor e lote);

— Critérios definidos para que o ensaio seja considerado positivo, negativo ou inconclusivo.

Verificação da aceitabilidade:

— Fator de indução de cada placa de ensaio e se cumprem o mínimo exigido pelo ensaio com base em controlos históricos;

— Valores reais para critérios de aceitabilidade, por exemplo, $\log_{10}$ (EC_{50}), $\log_{10}$ (PC_{50}), $\log_{10}$ (IC_{50}) e valores da curva de Hill para os controlos positivos/padrões de referência;

Resultados:

— Dados brutos e normalizados;

— Nível do fator de indução máximo;

— Dados relativos à citotoxicidade;

— Se existir, a concentração mínima eficaz (LEC);

— Valores $RPC_{máx}$, $PC_{máx}$, PC_{50}, IC_{50} e/ou EC_{50}, consoante o caso;

— Relação concentração-resposta, quando for possível determiná-la;

▼M8

— Análise estatística, se for caso disso, associada a uma medida de erro e confiança (por exemplo, SEM, DP, CV ou IC 95 %) e descrição da forma como os valores foram obtidos.

Discussão dos resultados

Conclusão

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(1) OCDE (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(2) OCDE (2015). Report of the Inter-Laboratory Validation for Stably Transfected Transactivation Assay to detect Estrogenic and Anti-estrogenic Activity. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 225), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(3) ICCVAM (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method, an *In Vit*ro Method for Identifying ER Agonists and Antagonists, National Institute of Environmental Health Sciences: Research Triangle Park, NC.

(4) Pujol P. *et al.* (1998). Differential Expression of Estrogen Recetor-Alpha and -Beta Messenger RNAs as a Potential Marker of Ovarian Carcinogenesis, Cancer. Res., 58(23): p. 5367-73.

(5) Rogers J.M. and Denison M.S. (2000). Recombinant Cell Bioassays for Endocrine Disruptors: Development of a Stably Transfected Human Ovarian Cell Line for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Chemicals, *In Vitro* and Molecular Toxicology: Journal of Basic and Applied Research, 13(1): p. 67-82.

(6) OCDE (2012). Performance Standards For Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assay to Detect Estrogen Recetor Agonists (for TG 455). Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 173.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(7) OCDE (2015). Performance Standards For Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assay to Detect Estrogen Recetor Antagonists. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 174.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(8) OCDE (2012). Guidance Document on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 150.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(9) Cavailles V. (2002). Estrogens and Recetors: an Evolving Concept. Climacteric, 5 Suppl 2: p. 20- 6.

(10) Welboren W.J. *et al.* (2009). Genomic Actions of Estrogen Recetor Alpha: What are the Targets and how are they Regulated? Endocr. Relat. Cancer, 16(4): p. 1073-89.

(11) Younes M. and Honma N. (2011). Estrogen Recetor Beta, Arch. Pathol. Lab. Med., 135(1): p. 63- 6.

▼**M8**

(12) Jefferson W.N., *et al.* (2002). Assessing Estrogenic Activity of Phytochemicals Using Transcriptional Activation and Immature Mouse Uterotrophic Responses, Journal of Chromatography B, 777(1-2): p. 179--189.

(13) Sonneveld E. *et al.* (2006). Comparison of I*n Vitro* and *In Vivo* Screening Models for Androgenic and Estrogenic Activities, *Toxicol*. Sci., 89(1): p. 173-187.

(14) Takeyoshi M. *et al.* (2002). The Efficacy of Endocrine Disruptor Screening Tests in Detecting Anti- Estrogenic Effects Downstream of Recetor-Ligand Interactions, Toxicology Letters, 126(2): p. 91- 98.

(15) Combes R.D. (2000). Endocrine Disruptors: a Critical Review of *In Vitro* and *In Vivo* Testing Strategies for Assessing their Toxic Hazard to Humans, ATLA Alternatives to Laboratory Animals,28(1): p. 81--118.

(16) Escande A. *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Recetor Alpha or Beta, Biochem. Pharmacol,71(10): p. 1459-69.

(17) Gray L.E. Jr. (1998). Tiered Screening and Testing Strategy for Xenoestrogens and Antiandrogens, *Toxicol*. Lett, 102-103, 677-680.

(18) EDSTAC (1998). Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) Final Report.

(19) ICCVAM (2003). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Recetor and Androgen Recetor Binding and Transcriptional Activation Assays.

(20) Gustafsson J.Ö. (1999). Estrogen Recetor ß - A New Dimension in Estrogen Mechanism of Action, Journal of Endocrinology, 163(3): p. 379-383.

(21) Ogawa S. *et al.* (1998). The Complete Primary Structure of Human Estrogen Recetor ß (hERß) and its Heterodimerization with ERα *In Vivo* and *In Vitro,* Biochemical and Biophysical Research Communications, 243(1): p. 122-126.

(22) Enmark E. *et al.* (1997). Human Estrogen Recetor ß-Gene Structure, Chromosomal Localization, and Expression Pattern, Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism,82(12): p. 4258-4265.

(23) Ball L.J. *et al.* (2009). Cell Type- and Estrogen Recetor-Subtype Specific Regulation of Selective Estrogen Recetor Modulator Regulatory Elements, Molecular and Cellular Endocrinology, 299(2): p. 204-211.

(24) Barkhem T. *et al.* (1998). Differential Response of Estrogen Recetor Alpha and Estrogen Recetor Beta to Partial Estrogen Agonists/Antagonists, Mol. Pharmacol, 54(1): p. 105-12.

(25) Deroo B.J. and Buensuceso A.V. (2010). Minireview: Estrogen Recetor-ß: Mechanistic Insights from Recent Studies, Molecular Endocrinology, 24(9): p. 1703-1714.

(26) Harris D.M. *et al.* (2005). Phytoestrogens Induce Differential Estrogen Recetor Alpha- or Beta- Mediated Responses in Transfected Breast Cancer Cells, Experimental Biology and Medicine, 230(8): p. 558-568.

(27) Anderson J.N. Clark J.H. and Peck E.J.Jr. (1972). The Relationship Between Nuclear Recetor- Estrogen Binding and Uterotrophic Responses, Biochemical and Biophysical Research Communications, 48(6): p. 1460-1468.

▼**M8**

(28) Toft D. (1972). The Interaction of Uterine Estrogen Recetors with DNA, Journal of Steroid Biochemistry, 3(3): p. 515-522.

(29) Gorski J. *et al.* (1968), Hormone Recetors: Studies on the Interaction of Estrogen with the Uterus, Recent Progress in Hormone Research, 24: p. 45-80.

(30) Jensen E.V. *et al.* (1967), Estrogen-Recetor Interactions in Target Tissues, Archives d'Anatomie Microscopique et de Morphologie Experimentale, 56(3):p. 547-569.

(31) ICCVAM (2002). Background Review Document: Estrogen Recetor Transcriptional Activation (TA) Assay. Appendix D, Substances Tested in the ER TA Assay, NIH Publication Report (No 03-4505).

(32) Kanno J. *et al.* (2001). The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay to Screen Compounds for *In Vivo* Estrogenic Responses: Phase 1, Environ. Health Persp., 109:785-94.

(33) Kanno J. *et al.* (2003). The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase Two Dose -Response Studies, Environ. Health Persp., 111:1530-1549.

(34) Kanno J. *et al.* (2003), The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase Two – Coded Single-Dose Studies, Environ. Health Persp., 111:1550-1558.

(35) Geisinger *et al.* (1989) Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone recetors, Cancer 63, 280-288.

(36) Baldwin *et al.* (1998) BG-1 ovarian cell line: an alternative model for examining estrogen-dependent growth *in vitro*, *In Vitro* Cell. Dev. Biol. – Animal, 34, 649-654.

(37) Li, Y. *et al.* (2014) Research resource: STR DNA profile and gene expression comparisons of human BG-1 cells and a BG-1/MCF-7 clonal variant, Mol. Endo. 28, 2072-2081.

(38) Rogers, J.M. and Denison, M.S. (2000) Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors: development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenic and anti-estrogenic chemicals, *In Vitro* & Molec. Toxicol. 13, 67-82.

▼M8

Apêndice 1

DEFINIÇÕES E ABREVIATURAS

Adequação: descrição da relação de um ensaio com o objeto de interesse e da sua importância e utilidade para um determinado fim. Traduz a medida em que o ensaio mede ou prevê corretamente o efeito biológico em causa. A adequação comporta a exatidão (concordância) de um ensaio (1).

Agonista: substância que produz uma resposta, por exemplo, transcrição, quando se liga a um recetor específico.

Antagonista: tipo de ligando a recetor ou produto químico que não provoca uma resposta biológica com a ligação a um recetor, mas bloqueia ou amortece respostas mediadas por agonistas.

ARN: ácido ribonucleico.

Atividade antiestrogénica: capacidade de um produto químico de suprimir a ação do 17β-estradiol mediada por recetores de estrogénios.

Atividade estrogénica: a capacidade de um produto químico reproduzir o 17β--estradiol na sua capacidade de se fixar em recetores de estrogénio e de os ativar. O presente método de ensaio permite detetar atividade estrogénia mediada por hERα.

CF: quadro conceptual da OCDE para ensaio e avaliação de desreguladores do sistema endócrino.

Citotoxicidade: efeitos nocivos para a estrutura ou a função celular que podem causar a morte celular e se podem traduzir numa redução do número de células presentes no poço no final do período de exposição ou numa redução da capacidade para uma medida da função celular, quando comparada com o controlo do veículo simultâneo.

Critérios de aceitabilidade: normas mínimas para a realização de controlos experimentais e padrões de referência. Para que uma experiência seja considerada válida, devem ser satisfeitos todos os critérios de aceitabilidade.

CP (Amostra de controlo positivo): substância fortemente ativa, de preferência 17ß-estradiol, que é incluída em todos os ensaios para ajudar a garantir o bom funcionamento do método.

CP_{10}: concentração do produto químico em estudo a que a atividade medida num ensaio de agonistas é igual a 10 % da atividade máxima induzida pelo controlo positivo (E2 a 1nM para o ensaio STTA) em cada placa.

CP_{50}: concentração do produto químico em estudo em que a atividade medida num ensaio de agonistas é igual a 50 % da atividade máxima induzida pelo PC (E2 com a concentração de referência indicada no método de ensaio) em cada placa.

$CP_{máx}$: concentração do produto químico em estudo que induz a RPC Máx.

CV: coeficiente de variação.

Competência técnica: capacidade comprovada para efetuar um ensaio de forma adequada antes de ensaiar substâncias desconhecidas.

Controlo positivo fraco: substância fracamente ativa, selecionada a partir da lista de substâncias químicas de referência que está incluída em todos os ensaios a fim de assegurar o correto funcionamento do ensaio.

DCC-FBS: soro fetal bovino tratado com carvão revestido com dextrano.

DMEM: meio de Eagle modificado por Dulbecco.

▼**M8**

DMSO: dimetilsulfóxido.

DP: desvio-padrão.

E2: 17β-estradiol.

EC50: concentração semimáxima efetiva de um produto químico em estudo.

ED: desregulação do sistema endócrino.

Ensaio STTA: ensaio de transativação transfetada de forma estável, o ensaio de ativação transcricional ERα com recurso à linha celular HeLa 9 903.

Ensaio «me-too»: expressão coloquial para designar um método que é, estrutural e funcionalmente, semelhante a um método de ensaio de referência validado e aceite. O termo é sinónimo de «método de ensaio similar».

Estrogénio de referência (controlo positivo, PC): 17β-estradiol (E2, CAS 50--28-2).

Estudo: todo o trabalho experimental realizado para avaliar uma substância única e específica através de um ensaio específico. Um estudo compreende todas as etapas, incluindo ensaios de diluição da substância em estudo nos meios de ensaio, séries de ensaios preliminares para avaliações da gama, todas as séries de ensaios exaustivos necessárias, análises de dados, controlo de qualidade, avaliações de citotoxicidade, etc. A realização de um estudo permite a classificação da atividade do produto químico em estudo no alvo de toxicidade (ou seja, ativo, inativo ou inconclusivo), que é avaliada pelo método usado e por uma estimativa de potência em relação ao produto químico de referência positiva.

Exatidão (concordância): grau de concordância entre os resultados do ensaio e um valor de referência aceite. Constitui uma medida da eficiência do método e um aspeto da adequação. Este termo e o termo «concordância» são muitas vezes utilizados indistintamente para indicar a proporção de resultados corretos do método de ensaio (1).

ERE: elemento de resposta do estrogénio.

ERTA: transativação do recetor de estrogénio.

Especificidade: proporção de substâncias negativas/inativa que é corretamente classificada pelo ensaio. Constitui uma medida da exatidão de um método cujos resultados sejam estabelecidos em função de categorias e é um aspeto importante a ter em conta na avaliação da adequação de um método (1).

FBS: soro fetal bovino.

Fiabilidade: indica em que medida um ensaio pode ser reproduzido ao longo do tempo num mesmo laboratório e entre laboratórios utilizando o mesmo protocolo. A fiabilidade é avaliada com base nos valores calculados das reprodutibilidades intralaboratorial e interlaboratorial.

hERα: recetor alfa de estrogénio humano.

hERß: recetor beta de estrogénio humano.

HeLa: linha celular imortal do colo do útero humano.

HeLa9903: subclone da célula HeLa para a qual foram transfetados de forma estável hERαs e um gene repórter da luciferase.

▼**M8**

IC_{50}: concentração semimáxima efetiva de um produto químico em estudo inibidor.

ICCVAM: Comité de Coordenação Interagências na Validação de Métodos Alternativos.

LEC: menor concentração eficaz é a menor concentração do produto químico em estudo que produz uma resposta (ou seja, a menor concentração do produto químico em estudo em que o fator de indução é estatisticamente diferente do controlo do veículo concorrente).

Morfologia celular: forma e aspeto das células cultivadas numa única camada num único poço de uma placa de cultura de tecidos. As células que estão a morrer apresentam muitas vezes uma morfologia celular anormal.

MSE: meio sem estrogénio. Meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), complementado com 4,5 % de FBS tratado com carvão/dextrano, 1,9 % de L-glutamina e 0,9 % de «pen-strep».

MCE: Menor Concentração Eficaz. É a menor concentração do produto químico em estudo que produz uma resposta (ou seja, a menor concentração do produto químico em estudo em que o fator de indução é estatisticamente diferente do controlo do veículo concorrente).

Método de ensaio: no contexto do presente método de ensaio, um ensaio é uma das metodologias aceites como válidas para cumprir os critérios de desempenho indicados. Os componentes do ensaio incluem, por exemplo, a linha celular específica com as condições de crescimento associadas, o meio específico em que o ensaio é efetuado, as condições de configuração das placas, disposições e diluições dos produtos químicos em estudo, a par de outras medidas de controlo da qualidade exigidas e de etapas de avaliação dos dados conexas.

Método de ensaio validado: método de ensaio relativamente ao qual foram realizados estudos de validação com vista a determinar a sua adequação (incluindo a exatidão) e fiabilidade para um determinado fim. Importa referir que um método de ensaio validado pode não ser suficientemente exato e fiável para ser considerado aceitável para o fim pretendido (1).

Métodos de ensaio de referência: ensaios em que se baseia o PBTG 455.

MMTV: vírus do tumor mamário do rato.

MT: metalotioneína.

Normas de desempenho: normas assentes num método de ensaio validado que constituam uma base para avaliar a comparabilidade de um ensaio proposto que seja mecanística e funcionalmente similar. Incluem: (1) componentes essenciais do método de ensaio; (2) uma lista mínima de produtos químicos de referência, escolhidos de entre os produtos químicos utilizados para demonstrar o desempenho aceitável do método de ensaio validado; e (3) níveis de exatidão e fiabilidade comparáveis, baseados no que foi obtido para o método de ensaio validado, que o método de ensaio proposto deve demonstrar quando avaliado pela utilização da lista mínima de produtos químicos de referência (1).

OHT: 4-hidroxitamoxifeno.

Padrão de referência: substância de referência utilizada para demonstrar a adequação de um ensaio. O 17β-estradiol é o padrão de referência para os ensaios STTA e VM7Luc ER TA.

PBTG: diretriz de ensaio baseada no desempenho.

▼M8

Produto químico: uma substância ou mistura.

Produto químico em estudo: qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado o presente método de ensaio.

$RCP_{máx}$: nível máximo de resposta induzido pelo produto químico em estudo, expresso em percentagem da resposta induzida por 1 nM E2 na mesma placa.

RE: recetor de estrogénio.

Reprodutibilidade interlaboratorial: medida do grau em que diferentes laboratórios qualificados que utilizam o mesmo protocolo e testam as mesmas substâncias podem produzir resultados qualitativa e quantitativamente similares. A reprodutibilidade interlaboratorial é determinada durante os processos de pré-validação e validação e indica em que medida um método pode ser transferido com êxito entre laboratórios, igualmente designada «reprodutibilidade entre laboratórios» (1).

Reprodutibilidade intralaboratorial: medida do grau em que pessoal qualificado do mesmo laboratório consegue replicar resultados com êxito utilizando o mesmo protocolo, em momentos diferentes. Igualmente designada «reprodutibilidade intralaboratorial» (1).

RLU: unidades de luz relativas.

RPMI: meio RPMI 1 640 complementado com 0,9 % de «pen-strep» e 8,0 % de soro fetal bovino (FBS).

Sensibilidade: proporção de todas as substâncias positivas/ativas que é corretamente classificada pelo método. Constitui uma medida da exatidão de um método cujos resultados sejam estabelecidos em função de categorias e é um aspeto importante a ter em conta na avaliação da adequação de um método (1).

Série de ensaios: experiência individual que avalia a ação química sobre o resultado biológico do ensaio. Cada série de ensaios constitui uma experiência completa realizada em poços de células retiradas de um mesmo agregado de células ao mesmo tempo.

Série de ensaios independente: experiência realizada independente que avalia a ação química sobre o resultado biológico do ensaio, utilizando células de um conjunto diferente de produtos químicos recém-diluídos, realizada em dias diferentes ou no mesmo dia por pessoas diferentes.

Substância: nos termos do REACH, uma substância é definida como um elemento químico e seus compostos, no estado natural ou obtidos por qualquer processo de fabrico, incluindo qualquer aditivo necessário para preservar a sua estabilidade e qualquer impureza que derive do processo utilizado, mas excluindo qualquer solvente que possa ser separado sem afetar a estabilidade da substância nem modificar a sua composição. No contexto do sistema GHS da ONU é utilizada uma definição muito semelhante ([1]).

Substâncias para demonstração de competência: subconjunto das substâncias de referência incluídas nas normas de desempenho que podem ser utilizadas pelos laboratórios para demonstrar a sua competência técnica com um método de ensaio normalizado. Os critérios de seleção destas substâncias incluem normalmente o facto de representarem a gama de respostas, estarem comercialmente disponíveis e disporem de dados de referência de elevada qualidade.

([1]) Regulamento (CE) n.º 1907/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 18 de dezembro de 2006, relativo ao registo, avaliação, autorização e restrição dos produtos químicos (REACH), que cria a Agência Europeia dos Produtos Químicos, que altera a Directiva 1999/45/CE e revoga o Regulamento (CEE) n.º 793/93 do Conselho e o Regulamento (CE) N.º 1488/94 da Comissão, bem como a Directiva 76/769/CEE do Conselho e as Diretivas 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE e 2000/21/CE (JO L 396 de 30.12.2006, p. 1).

▼**M8**

TA (Transativação): início da síntese do mARN em resposta a um sinal químico específico, como uma ligação de um estrogénio no recetor de estrogénios.

Tratamento por carvão vegetal/dextrano: tratamento de soro utilizado na cultura celular. O tratamento com carvão vegetal/dextrano (frequentemente designado «separação») retira hormonas endógenas e proteínas de ligação de hormonas.

Transfeção estável: quando o ADN é transferido para células de cultura de modo a ser estavelmente integrado no genoma celular, o que resulta na expressão estável dos genes transfetados. Os clones de células transfetadas de forma estável são selecionados por marcadores estáveis (por exemplo, resistência ao G418).

Transcrição: síntese do mARN.

UVCB: substâncias químicas de composição desconhecida ou variável, produtos de reação complexos e materiais biológicos.

Validação: processo de estabelecimento da fiabilidade e adequação de uma determinada abordagem, método, processo ou avaliação para um determinado fim (1).

VC (controlo do veículo): solvente que é utilizado para dissolver os produtos químicos em estudo e de controlo; é testado exclusivamente na qualidade de veículo, sem adição de produtos químicos dissolvidos.

VM7: célula de adenocarcinoma imortalizada que endogenamente expressa o recetor de estrogénio.

VM7Luc4E2: linha celular VM7Luc4E2, obtida a partir de células VM7 imortalizadas de adenocarcinoma de origem humana, que expressam endogenamente ambas as formas do recetor de estrogénios (ERα e ERβ) e que foram transfetadas de forma estável, com o plasmídeo pGudLuc7.ERE. O plasmídeo contém quatro cópias de um oligonucleótido sintético que contém o elemento de resposta estrogénica a montante do promotor do tumor mamário viral do rato (MMTV) e o gene da luciferase do pirilampo

▼**M8**

Apêndice 2

RECETOR A DE ESTROGÉNIO HUMANO TRANSFETADO DE FORMA ESTÁVEL. ENSAIO DE TRANSATIVAÇÃO PARA DETEÇÃO DE ATIVIDADE ESTROGÉNICA AGONISTA E ANTAGONISTA NOS PRODUTOS QUÍMICOS COM RECURSO À LINHA CELULAR HERA--HELA-9903

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES (VER TAMBÉM INTRODUÇÃO GERAL)

1. O presente ensaio de transativação (TA) utiliza a linha celular hERα-HeLa--9 903 para detetar atividade estrogénica agonista mediada por um recetor de estrogénio humano alfa (hERα). O estudo de validação do ensaio de transativação transfetada de forma estável, realizado pelo Japanese Chemicals Evaluation and Research Institute (CERI), utilizando a linha celular hERα--HeLa-9 903 para detetar atividade estrogénica agonista e antagonista mediada pelo recetor alfa de estrogénio humano (hERα), demonstrou a adequação e a fiabilidade do ensaio para o fim a que se destina (1).

2. O ensaio foi concebido especificamente para a deteção de TA mediada pelo hERα, tendo como parâmetro a medição por quimioluminescência. No entanto, foram referidos sinais de luminescência não mediada pelo recetor em concentrações de fitoestrogénios superiores a 1 μM devido à sobreativação do gene repórter da luciferase (2) (3). Embora a curva de respostas à dose indique que a ativação real do sistema do ER ocorre a concentrações inferiores, é necessário examinar cuidadosamente a expressão da luciferase obtida em concentrações elevadas de fitoestrogénios ou de compostos similares suspeitos de produzirem o mesmo tipo de sobreativação de fitoestrogénios do gene repórter da luciferase nos sistemas de ensaio de ER TA transfetados de modo estável (apêndice 1).

3. Devem ler-se as secções «INTRODUÇÃO GERAL» e «COMPONENTES DO ENSAIO DE ER TA» antes de utilizar este ensaio para fins normativos. As definições e abreviaturas utilizadas no presente método de ensaio são descritas no apêndice 2.1.

PRINCÍPIO DO ENSAIO (VER TAMBÉM INTRODUÇÃO GERAL)

4. O presente ensaio é utilizado para fixar um sinal no recetor de estrogénio com um ligando. Após a ligação do ligando, o complexo recetor-ligando transloca-se para o núcleo, onde se fixa a elementos de resposta de ADN específicos e transativa um gene repórter da luciferase do pirilampo que provoca um aumento da expressão celular da enzima luciferase. A luciferina é um substrato que é transformado pela enzima luciferase num produto bioluminescente mensurável quantitativamente com um luminómetro. A atividade da luciferase pode ser avaliada de forma rápida e pouco onerosa, com vários conjuntos de ensaio existentes no mercado.

5. O sistema de ensaio utiliza a linha celular hERα-HeLa-9 903, que é derivada de um tumor do colo do útero humano, com dois elementos estavelmente inseridos: (i) o elemento de expressão hERαs (que codifica o recetor humano) e (ii) um elemento do repórter da luciferase pirilampo com cinco repetições de um elemento de vitelogenina responsivo ao estrogénio (ERE), conduzidos por um elemento TATA promotor de metalotioneína (MT) do rato. Foi demonstrado que o constituinte TATA MT do gene do rato tem o melhor desempenho, pelo que é frequentemente utilizado. Por conseguinte, esta linha celular hERIα-HeLa-9 903 pode medir a capacidade de um produto químico em estudo de induzir a transativação da expressão do gene da luciferase mediada pelo hERα.

▼M8

6. No caso do ensaio do agonista do ER, a interpretação dos dados baseia-se no facto de o nível máximo de resposta induzido por um produto químico em estudo ser ou não igual ou superior a uma resposta agonista igual a 10 % da resposta induzida por uma concentração indutora maximizada (1 nM) do agente de controlo positivo (PC) 17β-estradiol (E2) (ou seja, o PC_{10}). No caso do ensaio de antagonistas do ER, a interpretação dos dados baseia-se no facto de a resposta revelar, ou não, uma redução de pelo menos 30 % da atividade da resposta induzida pelo pico do controlo (25 pM de E2) sem citotoxicidade. A análise e a interpretação dos dados são abordadas em pormenor nos pontos 34 a 48.

PROCEDIMENTO

Linhas celulares

7. Para o ensaio, deve utilizar-se a linha celular HeLa-9 903 transfetada de modo estável. A linha celular pode ser obtida na Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB) Cell Bank ([1]), mediante a assinatura de um acordo de transferência de material (MTA).

8. Só devem ser utilizadas nos ensaios células caracterizadas como isentas de micoplasmas. O RT-PCR (reação em cadeia da polimerase em tempo real) é o método ideal para uma deteção sensível de infeção por micoplasmas (4) (5) (6).

Estabilidade da linha celular

9. Para monitorizar a estabilidade da linha celular, devem utilizar-se E2, 17α--estradiol, 17α-metiltestosterona e corticosterona como padrões de referência para ensaios de agonista, devendo ser medida uma curva completa de respostas à concentração da gama concentrações de ensaio constantes do quadro 1, pelo menos, uma vez sempre que o ensaio for realizado, devendo os resultados estar de acordo com os apresentados no quadro 1.

10. No caso do ensaio antagonista, devem ser medidas em paralelo, em cada série de ensaios, as curvas de concentração completas para dois padrões de referência – taxifeno e flutamida. A classificação qualitativa correta como positiva ou negativa para os dois produtos químicos deve ser monitorizada.

Cultura celular e condições de incubação em placas

11. As células devem ser mantidas em meio mínimo essencial de Eagle (EMEM) sem vermelho de fenol, complementado com 60 mg/l do antibiótico canamicina e 10 % de soro fetal bovino tratado com carvão revestido de dextrano (DCC-SFB), numa incubadora de CO_2 (5 % CO_2) a 37±1 °C. Quando atingem uma confluência de 75-90 %, as células podem ser subcultivadas em 10 ml de $0{,}4 \times 10^5 - 1 \times 10^5$ células/ml para recipientes de cultura de 100 mm. As células devem ser suspensas com 10 % de SFB-EMEM (que é o mesmo que EMEM com DCC-FBS) e, em seguida, colocadas em poços de uma microplaca a uma densidade de 1×10^4 células/(100 µl × poço). Em seguida, as células devem ser pré-incubadas numa incubadora com 5 % de CO_2 a 37±1 °C durante 3 horas antes da exposição ao produto químico. Os artigos de plástico não devem ter atividade estrogénica.

12. Para manter a integridade da resposta, as células devem ser cultivadas por mais do que uma passagem da cultura congelada nos meios condicionados e não devem ser cultivadas por mais de 40 passagens. No caso da linha celular hERα-HeLa-9 903, este período deve ser inferior a três meses. Contudo, o desempenho das células pode ser reduzido se forem cultivadas em condições de cultura inadequadas.

([1]) JCRB Cell Bank: National Institute of Biomedical Innovation, 7-6-8 Asagi Saito, Ibaraki-shi, Osaka 567-0085, Japan. Fax: +81-72-641-9812

▼M8

13. O DCC-FBS pode ser preparado como descrito no apêndice 2.2, ou obtido no comércio.

Critérios de aceitabilidade

Padrões de referência positivos e negativos para o ensaio de agonistas do ER

14. Antes e durante o estudo, deve verificar-se a capacidade de resposta do sistema de ensaio utilizando as concentrações adequadas de um estrogénio forte (E2), um estrogénio fraco (17α-estradiol), um agonista muito fraco (17α-metiltestosterona) e uma substância negativa (corticosterona). Os valores de gama aceitáveis derivados do estudo de validação (1) são indicados no quadro 1. Estes 4 padrões de referência concomitantes devem ser incluídos em todas as experiências e os resultados devem situar-se dentro dos limites admissíveis. Se tal não for o caso, deve averiguar-se a causa da impossibilidade de cumprir os critérios de aceitabilidade (por exemplo, manipulação das células, soro e antibióticos para a qualidade e concentração) e o ensaio deve ser repetido. Uma vez cumpridos os critérios de aceitabilidade, é essencial uma utilização consistente dos materiais de cultura celular para assegurar a variabilidade mínima dos valores de EC_{50}, PC_{50} and PC_{10}. Os quatro padrões de referência concorrentes, que devem ser incluídos em cada ensaio (realizado nas mesmas condições, incluindo os materiais, o nível de passagem das células e os técnicos), podem garantir a sensibilidade do ensaio, na medida em que os PC_{10} dos três padrões de referência positivos devem situar-se dentro da gama aceitável, tal como os PC_{50} e EC_{50}, quando puderem ser calculados (ver quadro 1).

Quadro 1

Gama de valores aceitáveis dos quatro padrões de referência para o ensaio de ER agonista

Nome	log(PC_{50})	log(PC_{10})	log(EC_{50})	Curva de Hill	Gama de ensaio
17β-Estradiol (E2) N.º CAS: 50--28-2	-11,4~-10,1	<-11	-11,3~-10,1	0,7~1,5	10^{-14}~10^{-8}M
17α-Estradiol N.º CAS: 57-91-0	-9,6~-8,1	-10,7~-9,3	-9,6~-8,4	0,9~2,0	10^{-12}~10^{-6}M
Corticosterona N.º CAS: 50-22-6	—	—	—	—	10^{-10}~10^{-4}M
17α-Metiltestosterona N.º CAS: 58-18-4	-6,0~-5,1	-8,0~-6,2	—	—	10^{-11}~10^{-5}M

Padrão de referência positivo e negativo para o ensaio de antagonistas do ER

15. Antes e durante o estudo, deve verificar-se a capacidade de resposta do sistema de ensaio utilizando as concentrações adequadas de uma substância positiva (tamoxifeno) e de uma substância negativa (flutamida). Os valores de gama aceitáveis derivados do estudo de validação (1) são indicados no quadro 2. Estes dois padrões de referência concorrentes devem ser tidos em conta em todas as experiências, devendo os resultados ser considerados corretos, conforme indicado nos critérios. Se tal não for o caso, há que determinar a causa do incumprimento dos critérios (por exemplo, manipulação de células, soro e antibióticos para a qualidade e a concentração) e o ensaio deve ser repetido. Além disso, devem calcular-se os valores IC_{50} para uma substância positiva (tamoxifeno), devendo os resultados situar-se dentro dos limites aceitáveis indicados. Quando os critérios de aceitabilidade tiverem sido alcançados, é essencial a utilização coerente dos materiais de cultura de células para assegurar a variabilidade mínima dos valores IC_{50}. Os dois padrões de referência concorrentes, que devem ser utilizados em cada experiência (realizadas nas mesmas condições, incluindo os materiais, o nível de passagem das células e os técnicos), podem garantir a sensibilidade do ensaio (ver quadro 2).

▼M8

Quadro 2

Critérios e gama de valores aceitáveis dos dois padrões de referência para o ensaio de antagonistas do ER

Nome	Critérios	log (IC_{50})	Gama de ensaio
Tamoxifeno N.º CAS: 10 540-29-1	Positivos: O IC_{50} deve ser calculado	-5,942~-7,596	10-10~10-5M
Flutamida N.º CAS: 13 311-84-7	Negativos: O IC_{30} não deve ser calculado	—	10-10~10-5M

Controlos positivos e controlo do veículo

16. O controlo positivo (PC) do ensaio de agonistas do ER (1 nM de E2) e do ensaio de antagonistas do ER (10 μM TAM) deve ser efetuado, pelo menos, em triplicado em cada placa. O veículo utilizado para dissolver um produto químico em estudo deve ser ensaiado como controlo do veículo (VC), pelo menos, em triplicado em cada placa. Além deste CV, se o PC utilizar um veículo diferente do produto químico em estudo, deve ensaiar-se outro CV, pelo menos em triplicado, na mesma placa com o PC.

Critérios de qualidade para o ensaio de agonistas do ER

17. A atividade da luciferase do controlo positivo (1 nM E2) deve ser pelo menos 4 vezes superior à do CV médio em cada placa. Este critério baseia-se na fiabilidade dos valores dos parâmetros do estudo de validação (historicamente um fator entre 4 e 30).

18. Em relação ao controlo de qualidade do ensaio, o fator de indução correspondente ao valor PC_{10} do PC simultâneo (1 nM E2 deve ser superior a 1+2DP do valor do fator de indução (=1) do VC simultâneo. Para efeitos de definição de prioridades, o valor PC_{10} pode ser útil para simplificar a análise de dados necessária comparativamente a uma análise estatística. Embora uma análise estatística forneça informações sobre a significância, essa análise não é um parâmetro quantitativo no que diz respeito ao potencial com base na concentração, pelo que é menos útil para efeitos de definição de prioridades.

Critérios de qualidade para o ensaio de antagonistas do ER

19. A atividade média da luciferase no pico do controlo (25 pM E2) deve ser pelo menos 4 vezes superior à atividade média do CV em todas as placas. Este critério é estabelecido com base na fiabilidade dos valores dos parâmetros do estudo de validação.

20. Em relação ao controlo de qualidade do ensaio, a ativação transcricional relativa (RTA) de 1 nM E2 deve ser superior a 100 %, a RTA de 1μM 4-hidroxitamoxifeno (OHT) deve ser inferior a 40,6 % e a RTA de 100 μM de digitonina (Dig) deve ser inferior a 0 %.

Demonstração da competência técnica do laboratório (ver os pontos 14 e os quadros 3 e 4 em «COMPONENTES DO ENSAIO DE ER TA» do presente método de ensaio).

Veículo

21. Deve utilizar-se como VC, ensaiado em paralelo, dimetilsulfóxido (DMSO) ou um solvente adequado, na concentração utilizada para os diferentes controlos positivos e negativos, bem como os produtos químicos em estudo. Estes devem ser dissolvidos num solvente que os dissolva e seja miscível no meio celular. A água, o etanol (95 % a 100 %de pureza) e o DMSO são veículos adequados. Caso se utilize DMSO, o seu teor não deve exceder 0,1 % (v/v). Para qualquer veículo, deve demonstrar-se que o volume máximo utilizado não é citotóxico e não interfere com o desempenho do ensaio.

▼M8

Preparação dos produtos químicos em estudo

22. Em geral, os produtos químicos em estudo devem ser dissolvidos em DMSO ou noutro solvente adequado e diluídos sequencialmente com o mesmo solvente, à razão de 1:10, a fim de preparar soluções para diluição no meio.

Solubilidade e citotoxicidade: Considerações para a determinação da gama de dosagem

23. Deve ser efetuado um ensaio preliminar para determinar a gama de concentrações adequada do produto químico em estudo e se este pode apresentar problemas de solubilidade ou citotoxicidade. Inicialmente, os produtos químicos são ensaiados até à concentração máxima de 1 μg/ml, 1 mg/ml ou 1 mM, consoante a que for mais baixa. Com base no grau de citotoxicidade ou na falta de solubilidade observados no ensaio preliminar, a primeira série de ensaios definitiva deve utilizar o produto químico em algoritmos sequenciais de diluições a partir da concentração máxima aceitável (por exemplo, 1 mM, 100 μM, 10 μM, etc.), observando a presença de turbidez, precipitado ou citotoxicidade. As concentrações da segunda e, se necessário, terceira séries de ensaios devem ser ajustadas conforme adequado para melhor caracterizar a curva de respostas à concentração e evitar concentrações que se verifique serem insolúveis ou produzam citotoxicidade excessiva.

24. No caso dos agonistas e antagonistas do ER, a presença de níveis crescentes de citotoxicidade pode alterar significativamente ou eliminar a resposta sigmoidal característica e deve ser tida em conta na interpretação dos dados. Devem utilizar-se métodos de ensaio de citotoxicidade que possam fornecer informações sobre a viabilidade de 80 % das células, com recurso a um ensaio adequado baseado na experiência adquirida no laboratório.

25. Caso os resultados do ensaio de citotoxicidade revelem que a concentração do produto químico em estudo reduziu o número de células em 20 % ou mais, esta concentração deve ser considerada citotóxica e devem excluir-se da avaliação as concentrações iguais ou superiores à de concentração citotóxica.

Exposição ao produto químico e organização das placas do ensaio

26. O procedimento relativo às diluições do produto químico (etapas 1 e 2) e à exposição a células (etapa) é o seguinte:

Etapa 1: Cada produto químico deve ser diluído sequencialmente em DMSO, ou num solvente apropriado, e adicionado aos poços de uma placa de microtitulação para atingir as concentrações sequenciais finais determinadas pelo ensaio preliminar de determinação das gamas de dosagem [geralmente, numa série de, por exemplo, 1 mM, 100 μM, 10 μM, 1 μM, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM e 10 pM (10^{-3}-10^{-11} M)] para ensaio em triplicado.

Etapa 2: diluição do produto químico: Em primeiro lugar, diluir 1,5 μl do produto químico em estudo no solvente até um volume de 500 μl no meio.

Etapa 3: exposição das células ao produto químico: Adicionar 50 μl da diluição com o meio (preparada na etapa 2) a um poço que contenha 10^4 células/100 μl/poço.

O volume final recomendado de meio para cada poço é de 150 μl. As amostras para ensaio e os padrões de referência podem ser afetados como indicado no quadro 3 e no quadro 4.

▼**M8**

Quadro 3

Exemplo da atribuição de concentração por placa dos padrões de referência na placa de ensaio no ensaio de agonistas do ER

Linha	17α-metiltestosterona			Corticosterona			17α-estradiol			E2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Conc. 1 (10 μM)	→	→	100 μM	→	→	1 μM	→	→	10 nM	→	→
B	Conc. 2 (1 μM)	→	→	10 μM	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	Conc. 3 (100 nM)	→	→	1 μM	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
D	Conc. 4 (10 nM)	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	Conc. 5 (1 nM)	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	Conc. 6 (100 pM)	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	Conc. 7 (10 pM)	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: Controlo do veículo (0,1 % DMSO), PC: Controlo positivo (1 nM E2)

27. Os padrões de referência (E2, (E2, 17α-estradiol, 17α-metiltestosterona devem ser ensaiados em todas as séries de ensaios (quadro 3). Apenas os poços do PC tratados com 1 nM de E2 que podem produzir a indução máxima de E2 e os poços de VC tratados com DMSO (ou solvente apropriado) devem ser incluídos em todas as placas de ensaio (quadro 4). Se forem utilizadas células de diferentes origens (p. ex. números de passagem diferentes, lotes diferentes, etc.) na mesma experiência, os padrões de referência devem ser ensaiados para cada origem de células.

Quadro 4

Exemplo de atribuição de concentrações a placas de ensaio e placas dos produtos químicos em estudo e de controlo das placas no ensaio de agonistas do ER

Linha	Produto químico em estudo 1			Produto químico em estudo 2			Produto químico em estudo 3			Produto químico em estudo 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Conc. 1 (10 μM)	→	→	1 mM	→	→	1 μM	→	→	10 nM	→	→
B	Conc. 2 (1 μM)	→	→	100 μM	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	Conc. 3 (100 nM)	→	→	10 μM	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→

▼**M8**

Linha	Produto químico em estudo 1			Produto químico em estudo 2			Produto químico em estudo 3			Produto químico em estudo 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
D	Conc. 4 (10 nM)	→	→	1 μM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	Conc. 5 (1 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	Conc. 6 (100 pM)	→	→	10 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	Cconc. 7 (10 pM)	→	→	1 nM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: Controlo do veículo (0,1 % DMSO), PC: Controlo positivo (1 nM E2)

Quadro 5

Exemplo de atribuição das concentrações por placa dos padrões de referência na placa de ensaio no ensaio de antagonistas do ER

Linha	Tamoxifeno			Flutamida			Produto químico em estudo 1			Produto químico em estudo 2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	conc. 1 (10 μM)	→	→	10 μM	→	→	10 μM	→	→	10 μM	→	→
B	conc. 2 (1 μM)	→	→	1 μM	→	→	1 μM	→	→	1 μM	→	→
C	conc. 3 (100 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→
D	conc. 4 (10 nM)	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→
E	conc. 5 (1 nM)	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→
F	conc. 6 (100 pM)	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→
G	0,1 % DMSO	→	→	→	→	→	1 μM OHT	→	→	100 μM Dig	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: Controlo do veículo (0,1 % DMSO), PC: Controlo positivo (1 nM E2), OHT: 4-hidroxitamoxifeno, Dig: digitonina.

= enriquecida com 25pM E2

28. Para avaliar a atividade antagonista dos produtos químicos, os poços de ensaio situados nas linhas A a G devem ser enriquecidos com 25pM E2. Os padrões de referência (tamoxifeno e flutamida) devem ser ensaiados em todas as séries de ensaios. Os poços de PC tratados com 1 nM de E2 que podem ser utilizados para o controlo da qualidade da linha celular hERα-HeLa-9 903, os poços VC tratados com DMSO (ou com um solvente adequado), os poços de 0,1 % de DMSO, tratados com adição de DMSO ao E2 enriquecido correspondente ao pico no controlo, os poços tratados com a concentração final 1 μM OHT e os poços tratados com 100 μM Dig devem ser incluídos em todas as placas de ensaio (quadro 5). A placa de ensaio subsequente deve ter a mesma configuração, sem poços de padrões de referência (quadro 6). Se forem utilizadas células de diferentes origens (p. ex,. números de passagem diferentes, lotes diferentes, etc.) na mesma experiência, os padrões de referência devem ser ensaiados para cada origem de células.

▼M8

Quadro 6

Exemplo de atribuição de concentrações de placas ao produto químico em estudo e de controlo na placa do ensaio de antagonistas do ER

Linha	Produto químico em estudo 1			Produto químico em estudo 2			Produto químico em estudo 3			Produto químico em estudo 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Conc. 1 (10 µM)	→	→	10 µM	→	→	10 µM	→	→	10 µM	→	→
B	Conc. 2 (1 µM)	→	→	1 µM	→	→	1 µM	→	→	1 µM	→	→
C	Conc. 3 (100 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→
D	Conc. 4 (10 nM)	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→
E	Conc. 5 (1 nM)	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→
F	Conc. 6 (100 pM)	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→
G	0,1 % DMSO	→	→	→	→	→	1 µM OHT	→	→	100 µM Dig	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: Controlo do veículo (0,1 % DMSO), PC: Controlo positivo (1 nM E2), OHT: 4-hidroxitamoxifeno, Dig: digitonina.

: Enriquecido com 25 pM E2

29. A ausência de efeitos de borda deve ser confirmada, conforme adequado; se houver suspeitas desses efeitos, a configuração das placas deve ser alterada para evitá-los. Pode utilizar-se, por exemplo, uma configuração que exclua os poços de borda.

30. Após a adição dos produtos químicos, as placas de ensaio devem ser incubadas numa incubadora com 5 % de CO_2, a 37 °C ±1 °C, durante 20 a 24 horas, para induzir os produtos génicos repórteres.

31. Os compostos altamente voláteis requerem considerações específicas. Nesses casos, os poços de controlo próximos podem gerar falsos positivos, o que deve ser apreciado à luz dos valores esperados e dos valores de controlo históricos. Nos poucos casos em que a volatilidade seja preocupante, a utilização de «selantes de placas» pode contribuir para isolar eficazmente os poços individuais durante os ensaios, sendo, por conseguinte, recomendada.

32. A repetição dos ensaios definitivos para o mesmo produto químico deve ser feita em dias diferentes, a fim de garantir a sua independência.

Ensaio da luciferase

33. Pode utilizar-se um reagente comercial de ensaio da luciferase [p. ex., Steady-Glo® Luciferase Assay System (Promega, E2510, ou equivalente)], desde que sejam respeitados os critérios de aceitação. Os reagentes do ensaio devem ser escolhidos com base na sensibilidade do luminómetro a utilizar. Caso se recorra ao sistema de ensaio padrão da luciferase – Cell Culture Lysis Reagent (p.e., Promega, E1531 ou equivalente) –, este deve ser utilizado antes da adição do substrato. O reagente de luciferase deve ser aplicado de acordo com as instruções do fabricante.

ANÁLISE DOS DADOS

Ensaio de agonistas do ER

34. No caso do ensaio de agonistas do ER, para obter a atividade transcricional relativa para o PC (1 nM de E2), os sinais de luminescência da mesma placa podem ser analisados de acordo com os seguintes passos (também são aceitáveis outros processos matemáticos equivalentes):

Etapa 1: Calcular o valor médio para o VC.

▼M8

Etapa 2: Subtrair o valor médio do VC de todos os poços, para normalizar os dados.

Etapa 3: Calcular a média para o PC normalizado.

Etapa 4: Dividir o valor normalizado de cada poço da placa pelo valor médio do PC normalizado (PC = 100 %).

O valor final de cada poço corresponde à atividade transcricional relativa desse poço em comparação com a resposta do PC.

Etapa 5: Calcular o valor médio da atividade transcricional relativa para cada grupo de concentração do produto químico em estudo. A resposta tem duas vertentes: a média da atividade transcricional (resposta) e a concentração a que ocorre a resposta (ver secção seguinte).

Considerações sobre a indução de EC_{50}, PC_{50} e PC_{10}

35. É necessária uma curva completa concentrações-resposta para o cálculo do EC_{50}, mas isso pode nem sempre ser possível ou praticável devido às limitações da gama de concentrações do ensaio – por exemplo, devido a problemas de citotoxicidade ou de solubilidade. No entanto, como o EC_{50} e o nível máximo de indução (correspondente ao valor mais elevado da equação de Hill) são parâmetros informativos, estes parâmetros devem ser comunicados sempre que possível. Para o cálculo do EC_{50} e do nível máximo de indução, deve utilizar-se *software* estatístico adequado (por exemplo, o *software* Graphpad Prism). Se a equação logística de Hill for aplicável aos dados das respostas às concentrações, o EC_{50} deverá ser calculado com recurso à seguinte equação (7):

Y = Inferior + (Superior-Inferior) / {1+10 [exp (log(EC_{50})-X) × curva de Hill]}, em que:

X é o logaritmo da concentração;

Y é a resposta e o Y começa na «inferior» e vai até à superior numa curva sigmoide. A inferior é fixada em zero na equação logística de Hill.

36. Para cada produto químico em estudo, devem apresentar-se:

O $RPC_{máx}$, que corresponde ao nível máximo de resposta induzido pelo produto químico em estudo, expresso em percentagem da resposta induzida por 1 nM E2 na mesma placa, bem como o $PC_{máx}$ (concentração associada ao $RPC_{máx}$); e

No caso de produtos químicos positivos, as concentrações que induzem o PC_{10} e, se for caso disso, o PC_{50}.

37. O valor PCx pode ser calculado através da interpolação entre 2 pontos na coordenada X-Y, um imediatamente acima e um imediatamente abaixo de um valor PCx. Se os pontos de dados situados imediatamente acima e abaixo do valor PCx tiverem as coordenadas (a, b) e (c, d), respetivamente, o valor PCx pode ser calculado pela seguinte equação:

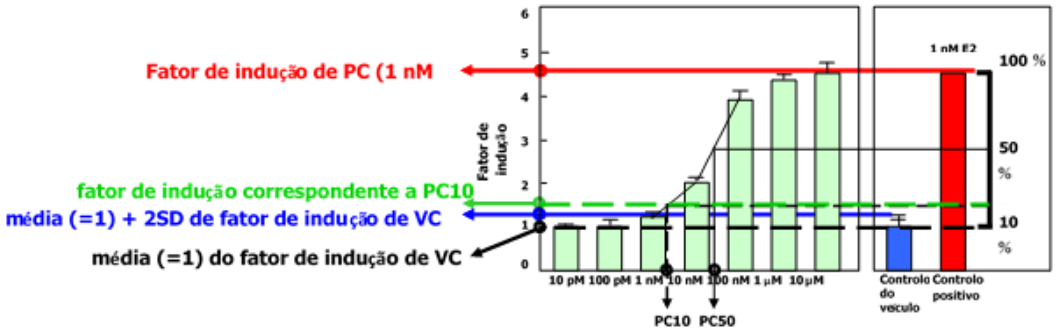
log[PCx] = log[c]+(x-d)/(d-b).

▼M8

38. As descrições dos valores dos PC constam da figura 1.

Figura 1

Exemplo de como calcular valores do PC. O PC (1 nM de E2) é incluído em todas as placas de ensaio



Ensaio de antagonistas do ER

39. No caso do ensaio de antagonistas do ER, para obter a atividade transcricional relativa (RTA) do pico do controlo (25 pM de E2), os sinais de luminescência da mesma placa podem ser analisados de acordo com as seguintes etapas (também são aceitáveis outros processos matemáticos equivalentes):

Etapa 1: Calcular o valor médio para o VC.

Etapa 2: Subtrair o valor médio do VC de todos os poços, para normalizar os dados. Etapa 3: Calcular a média dos picos de controlo normalizados.

Etapa 4: Dividir o valor normalizado de cada poço da placa pelo valor médio do pico do controlo normalizado (pico de controlo = 100 %).

O valor final de cada poço corresponde à atividade transcricional relativa desse poço em comparação com a resposta do pico de controlo.

Etapa 5: Calcular o valor médio da atividade transcricional relativa para cada tratamento.

Considerações de indução de IC_{30} e IC_{50}

40. No caso de produtos químicos positivos, devem indicar-se as concentrações que induzem o IC_{30} e, se for caso disso, o IC_{50}.

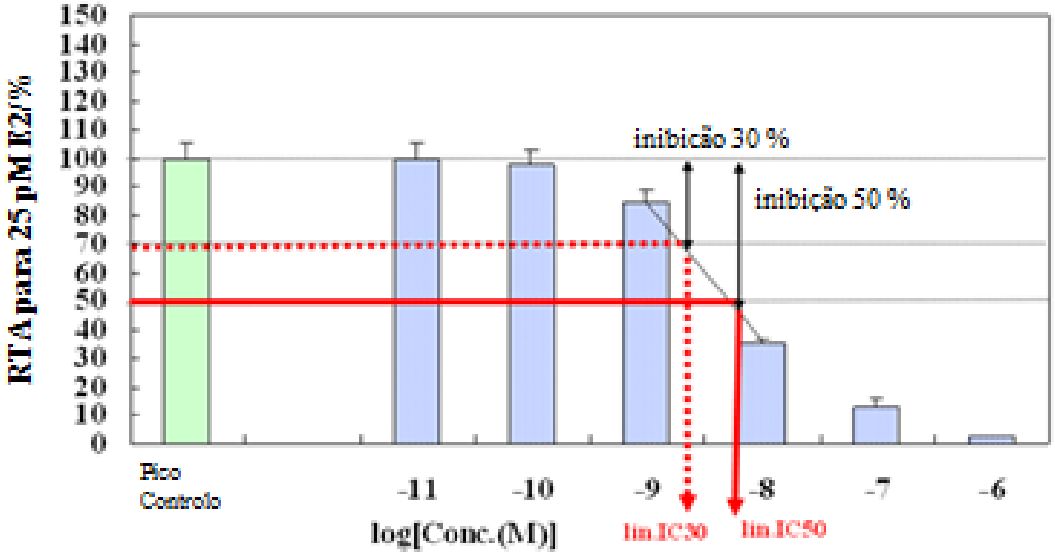
41. O valor ICx pode ser calculado através da interpolação entre 2 pontos na coordenada X-Y, um imediatamente acima e um imediatamente abaixo de um valor ICx. Se os pontos situados imediatamente acima e abaixo do valor ICx tiverem as coordenadas (c, d) e (a, b), respetivamente, o valor ICx pode ser calculado pela seguinte equação:

lin ICx = a-[b-(100-x)] (a-c) /(b-d)

▼M8

Figura 2

Exemplo de como calcular valores IC. O pico de controlo (25 pM de E2) está incluído em todas as placas de ensaio



RTA: atividade transcricional relativa

42. Os resultados devem basear-se em duas (ou três) séries de ensaios independentes. Se duas séries derem resultados compráveis e, por conseguinte, reprodutíveis, não é necessário realizar uma terceira série de ensaios. Para serem aceitáveis, os resultados devem:

— Cumprir os critérios de aceitabilidade (ver critérios de aceitabilidade, pontos 14-20),

— Ser reprodutíveis.

Critérios de interpretação dos dados

Quadro 7

Critérios de decisão positiva e negativa no ensaio de agonistas do ER

Positiva	Se o $RPC_{máx}$ obtido for igual ou superior a 10 % da resposta do controlo positivo em, pelo menos, duas de duas ou duas de três séries de ensaios.
Negativa	Se a $RPC_{máx}$ não atingir, pelo menos, 10 % da resposta do controlo positivo em duas de duas ou duas de três séries de ensaios.

Quadro 8

Critérios de decisão positiva e negativa no ensaio de antagonistas do ER

Positiva	Se o IC_{30} for calculado em, pelo menos, duas de duas ou duas de três séries de ensaios.
Negativa	Se o IC_{30} não pode ser calculado em duas de duas ou duas de três séries de ensaios.

▼**M8**

43. Os critérios de interpretação dos dados constam dos quadros 7 e 8. Os resultados positivos serão caracterizados pela magnitude do efeito e pela concentração a que o efeito ocorre. Se os resultados forem expressos como uma concentração à qual se obtêm os valores de 50 % (PC_{50}) ou 10 % (PC_{10}) de PC, para o ensaio de agonistas, e 50 % (IC_{50}) ou 30 % (IC_{30}) dos valores de inibição do pico de controlo, para o ensaio de antagonistas, estão cumpridos ambos os objetivos. No entanto, um produto químico em estudo é considerado positivo se a resposta máxima induzida pelo produto químico em estudo ($RPC_{máx}$) for igual ou superior a 10 % da resposta do PC em, pelo menos, duas de duas ou duas de três séries de ensaios, sendo considerado negativo se a $RCP_{máx}$ não corresponder a, pelo menos, 10 % da resposta do controlo positivo em duas de duas ou duas de três séries de ensaios.

44. Os cálculos de PC_{10}, PC_{50} e $PC_{máx}$ no ensaio de agonistas do ER e de IC_{30} e IC_{50} no ensaio de antagonistas do ER podem ser efetuados com recurso a uma folha de cálculo disponibilizada com a *Test Guideline* no sítio Web público da OCDE ([1]).

45. Essa folha de cálculo deve ser suficiente para obter os valores de PC_{10} ou PC50 e de IC_{30} ou IC_{50} pelo menos duas vezes. Porém, se os dados de base resultantes para o mesmo intervalo de concentração mostrarem variabilidade com um coeficiente de variação (CV %) – inaceitavelmente elevado –, os dados não podem considerar-se fiáveis e importa identificar a origem da elevada variabilidade. O CV dos triplicados dos dados brutos (ou seja, os dados relativos à intensidade de luminescência) dos pontos utilizados para o cálculo do PC_{10} deve ser inferior a 20 %.

46. O cumprimento dos critérios de aceitabilidade indica que o sistema de ensaio está a funcionar corretamente, mas não assegura que uma determinada operação produza dados exatos. A duplicação dos resultados da primeira série de ensaios é a melhor garantia de que foram produzidos dados exatos.

47. No caso do ensaio de agonistas do ER, em que são necessárias mais informações para além dos fins de monitorização e priorização da presente *Test Guideline* para produtos químicos positivos, especialmente para produtos químicos PC_{10}-PC_{49}, bem como para produtos químicos suspeitos de estimular excessivamente a luciferase, pode confirmar-se que a atividade da luciferase observada é unicamente uma resposta específica do antagonista do ERα, utilizando um antagonista do ERα (ver apêndice 2.1).

RELATÓRIO DO ENSAIO

48. Ver ponto 20 dos «COMPONENTES DO ENSAIO ER TA».

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(1) OCDE (2015). Report of the Inter-Laboratory Validation for Stably Transfected Transactivation Assay to detect Estrogenic and Anti-estrogenic Activity. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 225), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(2) Escande A., *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Recetor Alpha or Beta, *Biochem. Pharmacol.,* 71, 1 459-1 469.

(3) Kuiper G.G., *et al.* (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Recetor Beta, *Endocrinol.,* 139, 4 252--4 263.

([1]) http://www.oecd.org/env/testguidelines

▼**M8**

(4) Spaepen M., *et al.* (1992). Detection of Bacterial and Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Polymerase Chain Reaction, FEMS Microbiol. Lett., 78(1), 89-94.

(5) Kobayashi H., *et al.* (1995). Rapid Detection of Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Enzymatic Detection of Polymerase Chain Reaction (PCR) Products, J. Vet. Med. Sci., 57(4), 769- 71.

(6) Dussurget O. and Roulland-Dussoix D. (1994). Rapid, Sensitive PCR-Based Detection of Mycoplasmas in Simulated Samples of Animal Sera, *Appl.* Environ. *Microbiol*., 60(3), 953-9.

(7) De Lean A., Munson P.J. and Rodbard D. (1978). Simultaneous Analysis of Families of Sigmoidal Curves: Application to Bioassay, Radioligand Assay, and Physiological Dose-Response Curves, Am. J. *Physiol*., 235, E97-El02.

▼**M8**

Apêndice 2.1

FALSOS POSITIVOS: AVALIAÇÃO DE SINAIS DE LUMINESCÊNCIA NÃO MEDIADOS PELO RECETOR

1. No ensaio de agonistas do ER, podem ser gerados falsos positivos pela ativação do gene da luciferase não mediada pelo ER, pela ativação direta do produto génico ou por fluorescência independente. Esses efeitos são indicados por uma curva incompleta ou invulgar de respostas às dosagens. Se tais efeitos forem suspeitos, deve examinar-se o efeito na resposta de um antagonista do ER [por exemplo, 2-hidroxitamoxifeno (OHT) numa concentração não tóxica]. O antagonista ICI 1827 80 pode não ser adequado para este efeito, uma vez que uma concentração suficiente de ICI 1827 80 pode diminuir o valor do VC, o que irá afetar a análise dos dados.

2. Para assegurar a validade desta abordagem, é necessário ensaiar o seguinte na mesma placa:

   — Atividade agonística do produto químico desconhecido, com /sem 10 μM de OHT

   — VC (em triplicado)

   — OHT (em triplicado)

   — 1 nM de E2 (em triplicado) como PC agonista

   — 1 nM de E2 + OHT (em triplicado)

Critérios de interpretação dos dados

Nota: Todos os poços devem ser tratados com a mesma concentração do veículo.

— Se a atividade agonística do produto químico desconhecido NÃO for afetada pelo tratamento com o antagonista do ER, este é classificado como «negativo».

— Se a atividade agonística do produto químico desconhecido for completamente inibida, devem aplicar-se os critérios de decisão.

— Se a atividade agonística na menor concentração for igual ou superior à resposta PC_{10}, o produto químico desconhecido é inibido de forma igual ou superior à resposta PC_{10}. Calcula-se a diferença das respostas dos poços não tratados e tratados com o antagonista do ER, devendo esta diferença ser considerada a resposta verdadeira, utilizada no cálculo dos parâmetros adequados para permitir uma decisão de classificação.

Análise dos dados

Verificar a norma de desempenho.

Verificar o CV entre os poços tratados nas mesmas condições.

1. Calcular a média do VC

2. Subtrair a média do VC de cada poço **não** tratado com OHT

3. Calcular a média do OHT

4. Subtrair a média do VC de cada poço tratado com OHT

5. Calcular a média do PC

6. Calcular a atividade transcricional relativa de todos os outros poços em relação ao PC.

▼**M8**

Apêndice 2.2

PREPARAÇÃO DE SORO TRATADO COM CARVÃO REVESTIDO DE DEXTRANO (DCC)

1. O tratamento do soro com carvão revestido de dextrano (DCC) é um método geral para a remoção de compostos estrogénicos do soro que é adicionado ao meio celular, a fim de excluir a resposta distorcida associada aos estrogénios residuais no soro. Podem ser tratados com este procedimento 500 ml de soro fetal bovino (FBS).

Componentes

2. São necessários os seguintes materiais e equipamentos:

Materiais

Carvão ativado

Dextrano

Cloreto de magnésio hexa-hidratado ($MgCl_2$ $6H_2O$)

Sacarose

1 M de solução-tampão HEPES (pH 7,4)

Água ultrapura produzida a partir de um sistema de filtros

Equipamento

Recipiente de vidro autoclavado (a dimensão deve ser adaptada); centrifugadora geral de laboratório (que pode ser regulada para uma temperatura de 4 °C)

Procedimento

3. O seguinte procedimento é ajustado para a utilização de tubos de centrifugação de 50 ml:

[Dia 1] Preparar uma suspensão de carvão revestido de dextrano com 1 l de água ultrapura contendo 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,25 M de sacarose, 2,5 g de carvão, 0,25 g de dextrano e 5 mM de HEPES; agitá-la a 4 °C, de um dia para o outro.

[Dia 2] Distribuir a suspensão por tubos de centrifugação de 50 ml e centrifugar a 10 000 rpm, a 4 °C, durante 10 minutos. Remover o sobrenadante e armazenar metade do sedimento de carvão a 4 °C para ser utilizado no dia 3. Suspender a outra metade do carvão vegetal com FBS descongelado suavemente para evitar precipitação e inativado pelo calor a 56 °C durante 30 minutos e, em seguida, transferir para um recipiente de vidro autoclavado, como um erlenmeyer. Agitar suavemente esta suspensão a 4 °C de um dia para o outro.

[Dia 3] Distribuir a suspensão com o FBS por tubos de centrifugação para centrifugação a 10 000 rpm a 4 °C, durante 10 minutos. Recolher o FBS e transferi-lo para os novos sedimentos de carvão preparados e armazenados no dia 2. Suspender os sedimentos de carvão e agitar suavemente esta suspensão a 4 °C num recipiente de vidro autoclavado, de um dia para o outro.

[Dia 4] Distribuir a suspensão para centrifugação a 10 000 rpm a 4 °C por 10 minutos e esterilizar o sobrenadante por filtração através de um filtro estéril de 0,2 μm. O FBS tratado com DCC deve ser armazenado a –20 °C e pode ser utilizado durante um ano.

▼M8

Apêndice 3

ENSAIO DE TRANSATIVAÇÃO DO RECETOR DE ESTROGÉNIO VM7LUC PARA IDENTIFICAR OS AGONISTAS E OS ANTAGONISTAS DO RECETOR DE ESTROGÉNIO

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES (VER TAMBÉM INTRODUÇÃO GERAL)

1. O presente ensaio utiliza a linha celular VM7Luc4E2 ([1]). Foi validado pelo National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (ICVAM), e pelo Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) (1). As linhas celulares VM7Luc expressam predominantemente ERα e uma pequena quantidade de ERβ endógenos (2) (3) (4).

2. O presente ensaio é aplicável a uma vasta gama de substâncias, desde que possam ser dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO; N.º CAS 67-68-5), não reajam com o DMSO ou com o meio de cultura das células e não sejam citotóxicas nas concentrações ensaiadas. Se não for possível utilizar o DMSO, pode utilizar-se outro veículo, como o etanol ou a água (ver ponto 12). O desempenho demonstrado pelo ensaio de (ant)agonistas VM7Luc ER TA sugere que os dados gerados com este ensaio podem informar sobre os mecanismos de ação mediados pelo ER e podem ser tidos em conta para a priorização de substâncias para a realização de ensaios complementares.

3. O presente ensaio foi especificamente concebido para a deteção de TA mediada por hERα e hERß, por medição da quimioluminescência como parâmetro final. A utilização de quimioluminescência em bioensaios é generalizada, em virtude da relação sinal/origem elevada. No entanto, a atividade de luciferase do pirilampo em ensaios baseados em células pode ser confundida por substâncias que inibem a enzima luciferase, causando tanto inibição aparente ou o aumento da luminescência devido à estabilização de proteínas. Além disso, em alguns ensaios de genes repórteres do ER baseados na luciferase, foram comunicados sinais de luminescência não mediados por recetores em concentrações de fitoestrogénios superiores a 1 μM, devido à sobreativação do gene repórter da luciferase. Embora a curva dose-resposta indique que a ativação real do sistema ER ocorre a concentrações inferiores, a expressão da luciferase obtida a concentrações elevadas de fitoestrogénios ou de compostos semelhantes suspeitos de produzir uma sobreativação do gene repórter da luciferase idêntica à dos fitoestrogénios deve ser cuidadosamente examinada nos sistemas de ensaio de ER TA transfetados de forma estável.

4. Devem ler-se a «INTRODUÇÃO GERAL» e os «COMPONENTES DO ENSAIO ER TA» antes de utilizar o presente ensaio para fins normativos. As definições e abreviaturas utilizadas no presente método de ensaio constam do apêndice 1.

([1]) Até junho de 2016, esta linha celular denominava-se linha celular BG1Luc. As células BG-1 foram originalmente descritas por Geisinger *et al*. (1998) (12) e posteriormente caracterizadas por investigadores do National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) (13). Há relativamente pouco tempo, verificou-se a existência de duas variantes das células BG-1 utilizadas pelos investigadores, BG-1 Fr e BG-1 NIEHS. Uma análise aprofundada, incluindo testes de ADN, destas duas linhas celulares BG-1, efetuada por Li *et al*. (2014) (14), revelou que a BG-1 Fr era única e que a BG-1 NIEHS – ou seja, a linha celular original utilizada para desenvolver o ensaio – não era a linha celular BG1 do carcinoma ovárico humano, mas sim uma variante da linha celular do cancro da mama humano, MCF7. A linha celular utilizada no ensaio, originalmente conhecida como BG1Luc4E2 (15), passará agora a designar-se VM7Luc4E2 («V» = variante; «M7» = células MCF7). De igual modo, o ensaio passará a designar-se VM7Luc ER TA. Embora mude a origem da linha celular em que se baseia o ensaio, tal não afeta os estudos de validação publicados nem a utilidade e aplicação do ensaio para rastreio de produtos químicos estrogénicos/antiestrogénicos.

▼M8

PRINCÍPIO DO ENSAIO (VER TAMBÉM INTRODUÇÃO GERAL)

5. O presente ensaio é utilizado para indicar uma ligação ao ER por ligando, seguida de uma translocação do complexo recetor-ligando ao núcleo. No núcleo, o complexo recetor-ligando fixa-se a elementos específicos de resposta do ADN e transativa o gene resposta (*luc*), o que resulta na produção da luciferase e na subsequente emissão de luz, que pode ser quantificada com o auxílio de um luminómetro. A atividade da luciferase pode ser rapidamente avaliada, de forma pouco onerosa, com uma série de conjuntos disponíveis no comércio. O VM7Luc ER TA utiliza uma linha celular do adenocarcinoma da mama humano, VM7, respondendo ao ER, que foi transfetada estavelmente com um constituinte do repórter *luc* do pirilampo sob o controlo de quatro elementos de resposta estrogénicos localizados a montante do promotor do vírus do tumor mamário do rato (MMTV), para detetar substâncias com atividade agonista ou antagonista do ER *in vitro*. Este promotor de MMTV apresenta apenas uma fraca reatividade cruzada com outras hormonas esteroides e não esteroides (8). Os critérios para a interpretação dos dados são descritos em pormenor no ponto 41. Rapidamente, é identificada uma resposta positiva por uma curva concentração-resposta com, pelo menos, três pontos com barras de erro não sobrepostas (±DP médio), bem como uma mudança de amplitude (unidade relativa de luz [RLU] normalizada) de, no mínimo, 20 % do valor máximo para o padrão de referência (17β-estradiol [E2; N.º CAS 50-28-2] para o ensaio de agonista, raloxifeno HCl [Ral; Nº CAS 84449-90-1]/E2 para o ensaio de antagonistas).

PROCEDIMENTO

Linha celular

6. Para o ensaio, deve utilizar-se a linha celular VM7Luc4E2 estavelmente transfetada. Na atualidade, esta linha celular apenas está disponível mediante acordo de licença técnica da Universidade da Califórnia, Davis, Califórnia, EUA ([1]), e da Xenobiotic Detection Systems Inc., Durham, North Carolina, EUA ([2]).

Estabilidade da linha celular

7. Para manter a estabilidade e a integridade da linha celular, as células devem ser cultivadas durante mais de uma passagem a partir da cultura-mãe congelada em meios de manutenção de células (ver ponto 9). Estas não devem ser cultivadas por mais de 30 passagens. Para a linha celular VM7Lu4E2, 30 passagens correspondem a cerca de três meses.

Cultura celular e condições de incubação em placas

8. Devem ser seguidos os procedimentos especificados na *Guidance on Good Cell Culture Practice* [Orientações de boas práticas de cultura celular] (5) (6), para garantir a qualidade de todos os materiais e métodos, a fim de manter a integridade, a validade e a reprodutibilidade dos trabalhos realizados.

9. As células VM7Luc4E2, são mantidas num meio RPMI 1640 suplementado com 0,9 % de «pen-strep» e 8,0 % de soro fetal bovino (FBS), numa incubadora de cultura de tecidos específica, a 37 ^{o}C ±1 ^{o}C, 90 % ±5 % de humidade e 5,0 % ±1 % CO_2/ar.

10. Quando atingirem uma confluência de cerca de 80 %, as células VM7Luc4E2 são subcultivadas e condicionadas durante 48 horas num ambiente sem estrogénios, antes de serem colocadas em placas com 96 poços para exposição aos produtos químicos em estudo e para análise da indução dependente de estrogénios da atividade da luciferase. O meio isento de

([1]) Michael S. Denison, Ph.D. Professor, Dept. of Environmental Toxicology, 4241 Meyer Hall, One Shields Ave, University of California, Davis, CA 95616, endereço de correio eletrónico: msdenison@ucdavis.edu, (530) 754-8649

([2]) Xenobiotic Detection Systems Inc. 1601 East Geer Street, Suite S, Durham NC, 27704 USA, endereço de correio eletrónico: info@dioxins.com, telefone: 919-688-4804, fax: 919-688-4404

▼M8

estrogénios (EFM) contém meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) sem vermelho de fenol, complementado com 4,5 % de FBS tratado com carvão/dextrano, 1,9 % de L-glutamina e 0,9 % de «pen-strep». Todo o material de plástico deve ser isento de atividade estrogénica [ver protocolo pormenorizado (7)].

Critérios de aceitabilidade

11. A aceitação ou rejeição de um ensaio baseia-se na avaliação do padrão de referência e dos resultados do controlo de todas as experiências realizadas numa placa de 96 poços. Cada padrão de referência é ensaiado em várias concentrações, havendo várias amostras de cada concentração de referência e de controlo. Os resultados são comparados com os controlos de qualidade (QC) para os parâmetros derivados das bases de dados agonistas e antagonistas históricos geradas por cada laboratório durante a demonstração de competência técnica. As bases de dados históricos são continuamente atualizadas com os padrões de referência e os valores de controlo. A mudança de equipamento ou das condições laboratoriais pode exigir a criação de bases de dados históricos atualizadas.

Ensaio de agonistas

Ensaio de determinação da gama

- Indução: A indução nas placas deve ser medida dividindo o valor médio mais elevado da unidade de luz relativa (RLU) – padrão de referência E2 – pelo valor médio RLU do controlo com DMSO. Normalmente, é atingido um nível de indução cinco vezes superior, mas, para efeitos de aceitação, a indução deve ser superior ou igual a quatro vezes.

- Resultados do controlo com DMSO: Os valores RLU de controlo do solvente devem ser 2,5 vezes superiores ao desvio-padrão do valor histórico do valor médio RLU do controlo do solvente histórico.

- Uma experiência que não cumpra um critério de aceitação deve ser rejeitada e repetida.

Ensaio global

Inclui critérios de aceitabilidade do ensaio de determinação da gama dos agonistas e o seguinte:

- Resultados do padrão de referência: A curva E2 de concentração-resposta do padrão de referência (curva concentração-resposta) deve ter uma forma sigmoidal e, no mínimo, três valores dentro da parte linear da curva concentração-resposta.

- Resultados do controlo positivo: Os valores RLU do controlo do metoxicloro devem ser superiores ao DMSO médio mais três vezes o desvio-padrão médio do DMSO.

- Uma experiência que não cumpra um critério de aceitação único deve ser rejeitada e repetida.

Ensaio de antagonistas

Ensaio de determinação da gama

- Redução: A redução na placa é medida dividindo a média do valor RLU do padrão de referência Ral/E2 mais elevado pelo valor médio RLU de controlo com DMSO. Normalmente, é atingido um nível de redução de fator cinco, mas, para efeitos de aceitação, a redução deve ser superior ou igual a um fator três.

- Resultados do controlo E2: Os valores RLU do controlo E2 devem situar-se no intervalo de 2,5 vezes o desvio-padrão do valor RLU histórico médio do controlo E2.

▼M8

- Resultados do controlo com DMSO: Os valores RLU do controlo com DMSO devem situar-se no intervalo de 2,5 vezes o desvio-padrão do valor RLU histórico médio do controlo do solvente.

- Uma experiência que não cumpra um dado critério de aceitação será rejeitada e repetida.

Ensaio global

Inclui os critérios de aceitação do ensaio de determinação da gama dos antagonistas e o seguinte:

- Resultados do padrão de referência: A curva concentração-resposta do padrão de referência Ral/E2 (curva concentração-resposta) deve ter uma forma sigmoidal e, no mínimo, três valores dentro da parte linear da curva concentração-resposta.

- Resultados do controlo positivo: Os valores RLU do controlo tamoxifeno/E2 devem ser inferiores ao controlo médio E2 menos três vezes o desvio-padrão do controlo médio E2.

- Uma experiência que não cumpra um qualquer critério de aceitação será rejeitada e repetida.

Padrões de referência, controlos positivos e controlos de veículo

Controlo do veículo (ensaios de agonistas e antagonistas)

12. O veículo utilizado para dissolver os produtos químicos em estudo deve ser sujeito a ensaio de controlo. O veículo utilizado durante a validação do ensaio VM7Luc ER TA foi 1 % (v/v) de dimetilsulfóxido (DMSO, N.º CAS 67-68-5) (ver ponto 24). Se for utilizado um veículo diferente do DMSO, todos os padrões de referência, controlos e produtos químicos em estudo devem ser ensaiados no mesmo veículo, se pertinente.

Padrão de referência (determinação de gama para agonistas)

13. O padrão de referência é o E2 (N.º CAS 50-28-2). Para os ensaios de determinação de gama, o padrão de referência é constituído por uma diluição sequencial de quatro concentrações de E2 ($1{,}84 \times 10^{-10}$, $4{,}59 \times 10^{-11}$, $1{,}15 \times 10^{-11}$ and $2{,}87 \times 10^{-12}$ M), sendo cada concentração ensaiada em dois poços.

Padrão de referência (completo para agonistas)

14. O E2 para um ensaio completo resulta de uma diluição em série de 1:2 constituída por 11 concentrações (de $3{,}67 \times 10^{-10}$ a $3{,}59 \times 10^{-13}$ M) de E2 em dois poços.

Padrão de referência (determinação de gama para antagonistas)

15. O padrão de referência é uma combinação de Ral (N.º CAS 84449-90-1) e E2 (N.º CAS 50-28-2). O RAL/E2 para a realização de ensaios de determinação de gama resulta de uma diluição em série de três concentrações de Ral ($3{,}06 \times 10^{-9}$, 7.67×10^{-10} e $1{,}92 \times 10^{-10}$M) mais uma concentração fixa ($9{,}18 \times 10^{-11}$ M) de E2 em dois poços.

Padrão de referência (completo para antagonistas)

16. O RAL/E2 de ensaio completo consiste numa diluição em série de 1:2 de Ral (de $2{,}45 \times 10^{-8}$ a $9{,}57 \times 10^{-11}$M) mais uma concentração fixa ($9{,}18 \times 10^{-11}$ M) de Ral/E2 constituída por nove concentrações de Ral/E2 em dois poços.

Controlo positivo fraco (agonistas)

17. O controlo positivo fraco é uma solução $9{,}06 \times 10^{-6}$ M *p,p'*-metoxicloro (metoxicloro; N.º CAS 72-43-5) em EFM.

▼M8

Controlo positivo fraco (antagonista)

18. O controlo positivo fraco é tamoxifeno (N.º CAS 10540-29-1) 3,36 × 10^{-6}M com 9,18 × 10^{-11} M E2 em EFM.

Controlo E2 (ensaio para antagonistas)

19. O controlo E2 é 9,18 × 10^{-11} M E2 em EFM, sendo utilizado como controlo negativo de base.

Fator de indução (agonistas)

20. A indução da atividade da luciferase do padrão de referência (E2) é medida dividindo o valor RLU médio mais elevado do padrão de referência E2 pelo valor RLU do controlo com DMSO médio, devendo o resultado ter um fator superior a quatro.

Fator de redução (antagonistas)

21. A atividade média da luciferase do padrão de referência (Ral/E2) é medida dividindo o valor RLU médio mais elevado do padrão de referência Ral/E2 pelo valor médio do DMSO, devendo ser superior ao triplo.

Demonstração de competência técnica do laboratório (ver ponto 14 e quadros 3 e 4 da secção «COMPONENTES DO ENSAIO ER TA» do presente método de ensaio)

Veículo

22. Os produtos químicos em estudo devem ser dissolvidos num solvente que os solubilize e ser miscíveis com o meio celular. A água, o etanol (95 % a 100 % de pureza) e o DMSO são veículos adequados. Caso seja utilizado DMSO, o seu teor não deve exceder 1 % (v/v). Para qualquer veículo, deve demonstrar-se que o volume máximo utilizado não é citotóxico e não interfere com a eficácia do ensaio. Os padrões de referência e os controlos são dissolvidos em 100 % de solvente e, em seguida, diluídos em concentrações adequadas em EFM.

Preparação dos produtos químicos em estudo

23. Os produtos químicos em estudo são dissolvidos em DMSO a 100 % (ou solvente adequado) e, em seguida, diluídos em concentrações adequadas. Antes de serem dissolvidos e diluídos, todos os produtos químicos em estudo devem estar à temperatura ambiente. As soluções do produto químico em estudo devem ser preparadas de novo para cada experiência. As soluções não devem ter precipitados ou turbidez percetíveis. Os padrões de referência e as culturas de controlo podem preparar-se a granel; contudo, o padrão de referência, as diluições de controlo e os produtos químicos em estudo finais devem ser preparados para cada experiência e utilizados nas 24 horas seguintes à preparação.

Solubilidade e citotoxicidade: considerações para a determinação da gama

24. O ensaio de determinação da gama é composto por sete pontos — diluições em série de 1:10 realizadas em duplicado. Inicialmente, os produtos químicos são ensaiados até à concentração máxima de 1 mg/ml (~1 mM), para o ensaio de agonistas, e 20 μg/ml (~10 M), para o ensaio de antagonistas. As experiências de determinação da gama são utilizadas para determinar o seguinte:

— Concentrações iniciais do produto químico em estudo a utilizar durante os ensaios completos

— Diluições do produto químico em estudo (1:2 ou 1:5) a utilizar durante os ensaios completos

▼M8

25. Os protocolos dos ensaios de agonistas e antagonistas (7) incluem uma avaliação da viabilidade/citotoxicidade celular, integrada nas determinações da gama e nos ensaios completos. O método de citotoxicidade que foi usado para avaliar a viabilidade celular durante a validação do VM7Luc ER TA (1) é um método qualitativo de observação visual graduado; no entanto, é possível utilizar um método quantitativo para a determinação da citotoxicidade - ver protocolo (7). Não podem utilizar-se dados de concentrações de produtos químicos em estudo que causem uma redução da viabilidade superior a 20 %.

Exposição ao produto químico em estudo e organização das placas do ensaio

26. As células são contadas e colocadas em placas de cultura de tecidos de 96 poços (2×10^5 células por poço) em EFM e incubadas durante 24 horas, para permitir que as células se fixem à placa. O EFM é removido e substituído pelos produtos químicos em estudo e de referência em EFM, incubados durante 19-24 horas. É necessário prestar especial atenção às substâncias altamente voláteis, porquanto os poços de controlo mais próximos podem gerar resultados falsos positivos. Nesses casos, a utilização de «selantes de placas» permite isolar eficazmente os poços individuais durante os ensaios, sendo, por conseguinte, recomendada.

Ensaios de determinação da gama

27. O ensaio de determinação da gama utiliza todos os poços da placa de 96 poços para ensaiar até seis produtos químicos em estudo em sete diluições em série 1:10 em duplicado (ver figuras 1 e 2).

— O ensaio de determinação da gama para agonistas utiliza quatro concentrações de E2 em duplicado como padrão de referência e quatro poços replicados para o controlo com DMSO.

— O ensaio de determinação da gama para agonistas utiliza três concentrações de Ral/E2 com $9{,}18 \times 10^{-11}$ M E2 em duplicado como padrão de referência, com três poços replicados para os controlos com E2 e DMSO.

Figura 1

Configuração da placa de 96 poços para o ensaio de determinação da gama para agonistas

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-1	TC2-1	TC2-1	TC3-1	TC3-1	TC4-1	TC4-1	TC5-1	TC5-1	TC6-1	TC6-1
B	TC1-2	TC1-2	TC2-2	TC2-2	TC3-2	TC3-2	TC4-2	TC4-2	TC5-2	TC5-2	TC6-2	TC6-2
C	TC1-3	TC1-3	TC2-3	TC2-3	TC3-3	TC3-3	TC4-3	TC4-3	TC5-3	TC5-3	TC6-3	TC6-3
D	TC1-4	TC1-4	TC2-4	TC2-4	TC3-4	TC3-4	TC4-4	TC4-4	TC5-4	TC5-4	TC6-4	TC6-4
E	TC1-5	TC1-5	TC2-5	TC2-5	TC3-5	TC3-5	TC4-5	TC4-5	TC5-5	TC5-5	TC6-5	TC6-5
F	TC1-6	TC1-6	TC2-6	TC2-6	TC3-6	TC3-6	TC4-6	TC4-6	TC5-6	TC5-6	TC6-6	TC6-6
G	TC1-7	TC1-7	TC2-7	TC2-7	TC3-7	TC3-7	TC4-7	TC4-7	TC5-7	TC5-7	TC6-7	TC6-7
H	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	VC	VC	VC	VC	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4

Abreviaturas: E2-1 a E2-4 = concentrações (da mais alta para a mais baixa) do padrão de referência E2; TC1-1 a TC1-7 = concentrações (da mais alta para a mais baixa) do produto químico em estudo 1 (TC1); TC2-1 a TC2-7 = concentrações (da mais alta para a mais baixa) do produto químico em estudo 2 (TC2); TC3-1 a TC3-7 = concentrações (da mais alta para a mais baixa) do produto químico em estudo 3 (TC3); TC4-1 a TC4-7 = concentrações (da mais alta para a mais baixa) do produto químico em estudo 4 (TC4); TC5-1 a TC5-7 = concentrações (da mais alta para a mais baixa) do produto químico em estudo 5 (TC5); TC6-1 a TC6-7 = concentrações (da mais alta para a mais baixa) do produto químico em estudo 6 (TC6); VC = controlo do veículo (DMSO [1 % v/v EFM.]).

▼M8

Figura 2

Configuração da placa de 96 poços para o ensaio de determinação da gama para antagonistas

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-1	TC2-1	TC2-1	TC3-1	TC3-1	TC4-1	TC4-1	TC5-1	TC5-1	TC6-1	TC6-1
B	TC1-2	TC1-2	TC2-2	TC2-2	TC3-2	TC3-2	TC4-2	TC4-2	TC5-2	TC5-2	TC6-2	TC6-2
C	TC1-3	TC1-3	TC2-3	TC2-3	TC3-3	TC3-3	TC4-3	TC4-3	TC5-3	TC5-3	TC6-3	TC6-3
D	TC1-4	TC1-4	TC2-4	TC2-4	TC3-4	TC3-4	TC4-4	TC4-4	TC5-4	TC5-4	TC6-4	TC6-4
E	TC1-5	TC1-5	TC2-5	TC2-5	TC3-5	TC3-5	TC4-5	TC4-5	TC5-5	TC5-5	TC6-5	TC6-5
F	TC1-6	TC1-6	TC2-6	TC2-6	TC3-6	TC3-6	TC4-6	TC4-6	TC5-6	TC5-6	TC6-6	TC6-6
G	TC1-7	TC1-7	TC2-7	TC2-7	TC3-7	TC3-7	TC4-7	TC4-7	TC5-7	TC5-7	TC6-7	TC6-7
H	Ral-1	Ral-2	Ral-3	VC	VC	VC	E2	E2	E2	Ral-1	Ral-2	Ral-3

Abreviaturas: E2= controlo E2; Ral-1 a Ral-3 = concentrações do padrão de referência raloxifeno/E2 (da mais alta para a mais baixa); TC1-1 a TC1-7 = concentrações (da mais alta para a mais baixa) do produto químico em estudo 1 (TC1); TC2-1 a TC2-7 = concentrações (da mais alta para a mais baixa) do produto químico em estudo 2 (TC2); TC3-1 a TC3-7 = concentrações (da mais alta para a mais baixa) do produto químico em estudo 3 (TC3); TC4-1 a TC4-7 = concentrações (da mais alta para a mais baixa) do produto químico em estudo 4 (TC4); TC5-1 a TC5-7 = concentrações (da mais alta para a mais baixa) do produto químico em estudo 5 (TC5); TC6-1 a TC6-7 = concentrações (da mais alta para a mais baixa) do produto químico em estudo 6 (TC6); VC = controlo do veículo = (DMSO [1 % v/v EFM.]).

Nota: Todos os produtos químicos em estudo são ensaiados na presença de 9,18 × 10-11 M E2.

28. O volume final recomendado de meio necessário para cada poço é de 200 µl. Utilizar apenas as placas de ensaio em que as células de todos os poços tiverem uma viabilidade igual ou superior a 80 %.

29. A determinação das concentrações iniciais do ensaio completo para agonistas é descrita pormenorizadamente no respetivo protocolo (7). Em síntese, utilizam-se os seguintes critérios:

— Se não houver pontos na curva de concentração do produto químico em estudo superiores à média mais três vezes o desvio-padrão do controlo com DMSO, os ensaios completos devem ser efetuados com uma diluição em série de 1:2 em 11 pontos a partir da concentração máxima solúvel.

— Se existirem pontos na curva de concentração do produto químico em estudo superiores à média mais três vezes o desvio-padrão do controlo com DMSO, a concentração inicial a utilizar para diluição em 11 pontos em ensaios completos deve ser uma unidade logarítmica mais elevada do que a concentração com que se obtém o valor RLU ajustado mais elevado na determinação da gama. O esquema de diluição de 11 pontos deve basear-se nas diluições de 1:2 ou de 1:5, de acordo com os seguintes critérios:

Utilizar uma diluição em série de 1:2 em 11 pontos se a gama de concentrações resultante abranger toda a gama de respostas com base na curva concentração-resposta gerada no ensaio de determinação da gama. Caso contrário, utilizar uma diluição de 1:5.

▼M8

— Se o produto químico em estudo apresentar uma curva de resposta à concentração bifásica no ensaio de determinação da gama de concentrações, ambas as fases devem também ser resolvidas no ensaio completo.

30. A determinação das concentrações iniciais para os ensaios completos para **antagonistas** é descrita pormenorizadamente no respetivo protocolo (7). Em síntese, utilizam-se os seguintes critérios:

— Se não existirem pontos da curva de concentração do produto químico em estudo inferiores à média menos o triplo do desvio-padrão do E2, deve efetuar-se um ensaio completo do controlo com uma diluição em série de 1:2 em 11 pontos com início na concentração máxima solúvel.

— Se existirem pontos na curva de concentrações do produto químico em estudo à média menos o triplo do desvio-padrão do E2, a concentração inicial a utilizar no esquema de diluição em 11 pontos em ensaios completos deve ser uma das seguintes:

• A concentração com que se obtém o mais baixo valor RLU ajustado na determinação da gama;

• A máxima concentração solúvel [ver protocolo relativo aos antagonistas (7), figura 14-2];

• A mais baixa concentração citotóxica [ver protocolo relativo aos antagonistas (7), figura 14-3 para um exemplo conexo].

— O esquema de diluição em 11 pontos terá como base uma série de diluições de 1:2 ou1:5, ou uma diluição de acordo com os seguintes critérios:

Utilizar uma diluição em série de 1:2 em 11 pontos se a gama de concentrações resultante abranger toda a gama de respostas, com base na curva concentração-resposta gerada no ensaio de determinação da gama. Caso contrário, utilizar uma diluição de 1:5.

Ensaios completos

31. Os ensaios completos consistem em diluições em série em 11 pontos (diluições em série de 1:2 ou 1:5 com base na concentração inicial dos critérios para ensaios completos), sendo cada concentração ensaiada em três poços da placa de 96 poços (ver figuras 3 e 4).

— Os ensaios completos para *agonistas* utilizam 11 concentrações de E2 em duplicado como padrão de referência. São incluídos em cada placa quatro poços replicados para o controlo com DMSO e quatro poços replicados para o controlo com metoxicloro ($9{,}06 \times 10^{-6}$ M);

— Os ensaios completos para *antagonistas* utilizam 9 concentrações de Ral/E2 com $9{,}18 \times 10^{-11}$ M E2 em duplicado como padrão de referência com quatro poços replicados para o controlo E2 $9{,}18 \times 10^{-11}$ M, quatro poços replicados para os controlos com DMSO e quatro poços replicados para tamoxifeno $3{,}36 \times 10^{-6}$M.

▼M8

Figura 3

Configuração da placa de 96 poços para o ensaio completo para agonistas

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
B	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
C	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
D	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	VC
E	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Met
F	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Met
G	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Met
H	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Met

Abreviaturas: TC11-1 a TC1-11 = concentrações (da mais alta para a mais baixa) do produto químico em estudo 1; 1 TC2-1 a TC2-11 = concentrações (da mais alta para a mais baixa) do produto químico em estudo 2; E2-1 a E2--11 = concentrações do padrão de referência E2 (da mais alta para a mais baixa); Met = controlo positivo fraco do *p,p'*- metoxicloro; VC = DMSO (1 % v/v) do controlo do veículo EFM

Figura 4

Configuração da placa de 96 poços para o ensaio completo para antagonistas

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
B	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
C	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
D	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	VC
E	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Tam
F	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Tam
G	Ral-1	Ral-2	Ral-3	Ral-4	Ral-5	Ral-6	Ral-7	Ral-8	Ral-9	E2	E2	Tam
H	Ral-1	Ral-2	Ral-3	Ral-4	Ral-5	Ral-6	Ral-7	Ral-8	Ral-9	E2	E2	Tam

Abreviaturas: E2 = controlo E2; Ral-1 a Ral-9 = concentrações do padrão de referência raloxifeno/E2 (da mais alta para a mais baixa); Tam = controlo positivo fraco tamoxifeno/E2; TC1-1 a TC1-11 = concentrações (da mais alta para a mais baixa) do produto químico 1 (TC1); TC2-1 a TC2-11 = concentrações (da mais alta para a mais baixa) do produto químico em estudo 2 (TC2); VC = controlo do veículo (DMSO [1 % v/v EFM.]).

Nota: Tal como referido, todos os poços de referência e de ensaio contêm uma concentração fixa de E2 ($9{,}18 \times 10^{-11}$M)

32. As repetições dos ensaios completos para o mesmo produto químico devem ser realizadas em dias diferentes, a fim de garantir a sua independência. Devem efetuar-se, pelo menos, dois ensaios completos. Se os seus resultados forem contraditórios (por exemplo, um ensaio é positivo, o outro negativo) ou se um dos ensaios for inadequado, deve realizar-se um terceiro ensaio.

Medição da luminescência

33. A luminescência é medida na gama de 300 a 650 nm, com um luminómetro de injeção e *software* de controlo do volume de injeção e do intervalo de medição (7). A emissão de luz de cada poço é expressa em RLU por poço.

▼M8

ANÁLISE DOS DADOS

Determinação de EC_{50} /IC_{50}

34. Os valores EC_{50} (metade da concentração efetiva máxima de um produto químico em estudo [agonistas]) e IC_{50} (metade da concentração inibitória de um produto químico em estudo [antagonistas]) são determinados a partir dos dados concentração-resposta. Para produtos químicos em estudo positivos em uma ou mais concentrações, a concentração que provoca uma resposta semimáxima (IC_{50} ou EC_{50}) é calculada com recurso a uma análise funcional de Hill ou a uma alternativa adequada. A análise de Hill é um modelo matemático logístico de quatro parâmetros, que relaciona a concentração do produto químico em estudo com a resposta (geralmente após uma curva sigmoidal), utilizando a equação seguinte:

$$Y = Base + \frac{(Topo - Base)}{1 + 10(lgEC_{50} - X)Declive}$$

em que:

Y = resposta (i.e., RLU);

X = o logaritmo de concentração;

Base = a resposta mínima;

Topo = a resposta máxima;

Log(EC_{50}) [ou log(IC_{50})] = o logaritmo de X como resposta intermédia entre o topo e a base;

Curva de Hill = o declive da curva.

O modelo calcula o valor mais adequado para o topo, a base, a curva de Hill e os parâmetros IC_{50} e EC_{50}. Para o cálculo dos valores de EC_{50} e IC_{50}, deve utilizar-se um *software* estatístico adequado (por exemplo, Graphpad Prism®).

Determinação de anomalias

35. Uma boa avaliação estatística pode ser facilitada pela inclusão (sem caráter limitativo) do ensaio-Q – ver protocolos relativos aos agonistas e antagonistas (7) –, para determinar os poços «inutilizáveis», a excluir da análise de dados.

36. Para os replicados do padrão de referência E2 (amostra de dois), qualquer valor RLU ajustado para um replicado a uma dada concentração de E2 é considerado anormal se o seu valor for superior ou inferior em mais de 20 % ao valor RLU ajustado para essa concentração, que consta da base de dados históricos.

Recolha e ajustamento dos dados do luminómetro para determinação da gama

37. Os dados brutos do luminómetro devem ser transferidos para um modelo de folha de cálculo concebida para o ensaio. Deve determinar-se se há pontos aberrantes que necessitem de ser excluídos (ver critérios de aceitação do ensaio para parâmetros determinados nas análises). Devem efetuar-se os cálculos a seguir indicados:

Agonistas

Etapa 1 Calcular o valor médio para o controlo do veículo (VC) DMSO

Etapa 2 Subtrair o valor médio do VC DMSO do valor de cada poço, a fim de normalizar os dados.

▼M8

Etapa 3 Calcular o fator de indução médio para o padrão de referência (E2).

Etapa 4 Calcular o valor médio de EC_{50} para os produtos químicos em estudo.

Antagonistas

Etapa 1 Calcular o valor médio do VC DMSO.

Etapa 2 Subtrair o valor médio do VC DMSO do valor de cada poço, a fim de normalizar os dados.

Etapa 3 Calcular o fator de redução médio para o padrão de referência (Ral/E2).

Etapa 4 Calcular o valor médio do padrão de referência E2.

Etapa 5 Calcular o valor médio de IC_{50} para os produtos químicos em estudo.

Recolha e ajustamento dos dados do luminómetro para o ensaio global

38. Os dados brutos do luminómetro devem ser transferidos para um modelo de folha de cálculo concebida para o ensaio. Deve determinar-se se há pontos aberrantes que necessitem de ser excluídos (ver critérios de aceitação do ensaio para parâmetros determinados nas análises). Efetuam-se os seguintes cálculos:

Agonistas

Etapa 1 Calcular o valor médio do VC DMSO.

Etapa 2 Subtrair o valor médio do VC DMSO do valor de cada poço, a fim de normalizar os dados.

Etapa 3 Calcular o fator de indução médio para o padrão de referência (E2).

Etapa 4 Calcular o valor médio de EC_{50} para E2 e para os produtos químicos em estudo.

Etapa 5 Calcular o valor RLU ajustado médio para o metoxicloro.

Antagonistas

Etapa 1 Calcular o valor médio do VC DMSO.

Etapa 2 Subtrair o valor médio do VC DMSO do valor de cada poço, a fim de normalizar os dados.

Etapa 3 Calcular o fator de indução médio para o padrão de referência (Ral/E2).

Etapa 4 Calcular o valor médio de IC_{50} para Ral/E2 e para os produtos químicos em estudo.

Etapa 5 Calcular o valor RLU ajustado médio para o tamoxifeno.

Etapa 6 Calcular o valor médio do padrão de referência E2.

▼M8

Critérios de interpretação dos dados

39. O VM7Luc ER TA destina-se a fazer parte de uma abordagem de ponderação das provas que contribuirá para priorizar substâncias para ensaios de ED *in vivo*. Uma parte deste procedimento de priorização consiste na classificação do produto químico em estudo como positivo ou negativo em termos de atividade agonista ou de atividade antagonista. Os critérios de decisão positiva e negativa utilizados no estudo de validação da VM7Luc ER TA são descritos no quadro 1.

Quadro 1

Critérios de decisão positivos e negativos

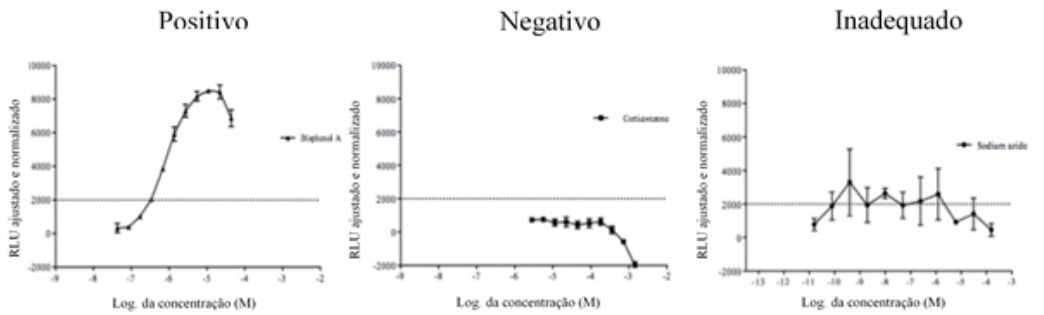
ATIVIDADE AGONISTA	
Positiva	— Todos os produtos químicos em estudo classificados como *positivo para a* atividade agonista do ER devem apresentar uma curva concentração-resposta que consista numa linha de base, seguida de uma inclinação positiva que termina num plano ou num pico. Em alguns casos, apenas duas destas características (linha de base–inclinação ou inclinação–pico) podem ser definidas. — A linha que define a inclinação positiva deve conter, pelo menos, três pontos com barras de erro não sobrepostas (DP ±média). Excluem-se os pontos que constituem a linha de base, mas a parte linear da curva pode incluir o pico ou o primeiro ponto do plano. — Uma classificação positiva requer uma amplitude de resposta, ou seja, a diferença entre a linha de base e o pico, de, pelo menos, 20 % do valor máximo para o padrão de referência E2 (i.e., 2000 RLU ou mais, se o valor máximo de resposta dos padrões de referência [E2] for ajustado para 10000 RLU). — Se possível, deve calcular-se um valor EC_{50} para cada produto químico em estudo positivo.
Negativa	O valor RLU ajustado médio para uma dada concentração é igual ou inferior ao valor RLU médio do controlo com DMSO mais três vezes o desvio-padrão do RLU do DMSO.
Inadequada	Os dados que não possam ser interpretados como válidos para demonstrar a presença ou ausência de atividade, devido a limitações qualitativas ou quantitativas importantes, são considerados inadequados e não podem ser utilizados para determinar se o produto químico é positivo ou negativo. Os produtos químicos em causa devem ser objeto de novo ensaio.
ATIVIDADE ANTAGONISTA	
Positiva	— Os dados do produto químico em estudo produzem uma curva concentração-resposta que consiste numa linha de base seguida de uma inclinação negativa. — A linha que define a inclinação negativa deve ter, pelo menos, três pontos com barras de erro não sobrepostas; os pontos que formam a linha de base são excluídos, mas a parte linear da curva pode incluir o primeiro ponto do plano. — Deve registar-se, pelo menos, uma redução de 20 % na atividade do valor máximo do padrão de referência Ral/E2 (i.e., 8000 RLU ou menos, quando o valor máximo da resposta do padrão de referência [Ral/E2] é ajustado para 10000 RLU). — As concentrações não citotóxicas mais elevadas do produto químico em estudo devem ser iguais ou inferiores a 1×10^{-5} M. — Se possível, deve calcular-se um valor IC_{50} para cada produto químico em estudo positivo.
Negativa	Todos os pontos de dados são acima do valor EC_{80} (80 % da resposta de E2 ou 8000 RLU), em concentrações inferiores a $1{,}0 \times 10^{-5}$ M.
Inadequada	Os dados que não possam ser interpretados como válidos para demonstrar a presença ou ausência de atividade devido a limitações qualitativas ou quantitativas importantes são considerados inadequados e não podem ser utilizados para determinar se o produto químico é positivo ou negativo. O produto químico em causa deve ser objeto de novo ensaio.

▼M8

40. Sempre que possível, os resultados positivos serão caracterizados pela magnitude do efeito e pela concentração a que este ocorre. Nas figuras 5 e 6, apresentam-se exemplos de dados positivos, negativos e inadequados.

Figura 5

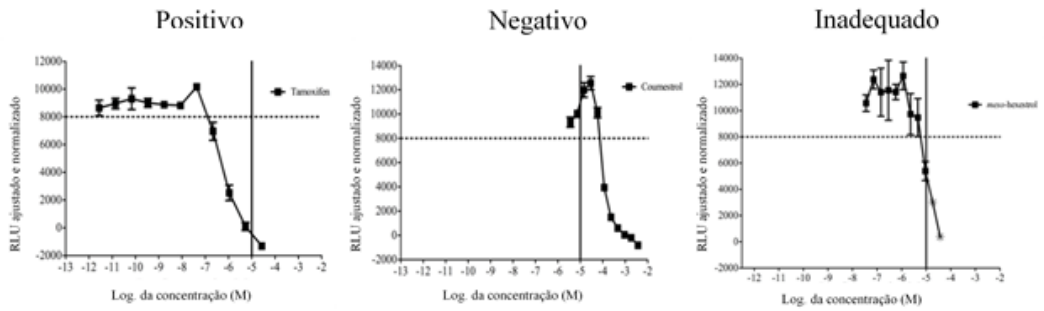
Exemplos de agonistas: Dados positivos, negativos e inadequados



A linha a tracejado indica 20 % da resposta do E2, 2000 RLU ajustados e normalizados.

Figura 6

Exemplos de antagonistas: Dados positivos, negativos e inadequados



A linha a tracejado indica 80 % da resposta de Ral/E2, 8000 RLU ajustados e normalizados.

A linha contínua indica 1,00 x 10^{-5} M. Para uma resposta ser considerada positiva, deve ser inferior à linha de 8000 RLU e em concentrações inferiores a 1,00 x 10^{-5} M.

As concentrações marcadas com asterisco no gráfico do meso-hexesterol indicam pontuações de viabilidade iguais ou superiores a «2».

Os resultados do ensaio para o meso-hexesterol são considerados inadequados porque a única resposta que está abaixo de 8000 RLU ocorre a 1,00 x 10^{-5} M.

41. Os cálculos de EC_{50} e IC_{50} podem ser feitos por recurso a uma função de Hill de quatro parâmetros (para mais informações, ver protocolo relativo aos agonistas e antagonistas) (7). O cumprimento dos critérios de aceitabilidade indica que o sistema está a funcionar corretamente, mas não assegura que uma determinada série de ensaios produz dados exatos. A duplicação dos resultados da primeira série de ensaios é a melhor garantia de que foram produzidos dados exatos (ver ponto 19 da secção «COMPONENTES DO ENSAIO ER TA»).

▼**M8**

RELATÓRIO DO ENSAIO

42. Ver ponto 20 dos «COMPONENTES DO ENSAIO ER TA».

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(1) ICCVAM. (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists, National Institute of Environmental Health Sciences: Research Triangle Park, NC.

(2) Monje P., Boland R. (2001). Subcellular Distribution of Native Estrogen Recetor α and β Isoforms in Rabbit Uterus and Ovary, J. Cell Biochem., 82(3): 467-479.

(3) Pujol P., *et al.* (1998). Differential Expression of Estrogen Recetor-Alpha and -Beta Messenger RNAs as a Potential Marker of Ovarian Carcinogenesis, Cancer Res., 58(23): 5367-5373.

(4) Weihua Z., *et al.* (2000). Estrogen Recetor (ER) β, a Modulator of ERα in the Uterus, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97(11): 936-5941.

(5) Balls M., *et al.* (2006). The Importance of Good Cell Culture Practice (GCCP), ALTEX, 23(Suppl): p. 270-273.

(6) Coecke S., *et al.* (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice: a Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, Alternatives to Laboratory Animals, 33: p. 261-287.

(7) ICCVAM (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report, The LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Recetor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals, NIH Publication No 11-7850.

(8) Rogers J.M., Denison M.S. (2000). Recombinant Cell Bioassays for Endocrine Disruptors: Development of a Stably Transfected Human Ovarian Cell Line for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Chemicals*, In Vitro* Mol. *Toxicol*.,13(1):67-82.

(9) Escande A., *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Recetor Alpha or Beta, Biochem. *Pharmacol*., 71(10):1459-69.

(10) Thorne N., Inglese J., Auld D.S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology, Chemistry and Biology,17(6):646-57.

(11) Kuiper G.G, *et al.* (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Recetor Beta, Endocrinology,139(10):4252-63.

(12) Geisinger, *et al.* (1989). Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone recetors, Cancer 63, 280-288.

(13) Baldwin, *et al.* (1998). BG-1 ovarian cell line: an alternative model for examining estrogen-dependent growth *in vitro*, *In Vitro* Cell. Dev. Biol. – Animal, 34, 649-654.

(14) Li, Y., *et al.* (2014). Research resource: STR DNA profile and gene expression comparisons of human BG-1 cells and a BG-1/MCF-7 clonal variant, Mol. Endo. 28, 2072-2081.

(15) Rogers, J.M. and Denison, M.S. (2000). Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors:development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenicand anti-estrogenic chemicals, *In Vitro* & Molec. Toxicol. 13, 67-82.

▼**M8**

Apêndice 4

ENSAIO DE TRANSATIVAÇÃO DE RECETOR-A DE ESTROGÉNIO HUMANO ESTAVELMENTE TRANSFETADO PARA DETEÇÃO DE ATIVIDADE ESTROGÉNICA AGONISTA E ANTAGONISTA NOS PRODUTOS QUÍMICOS COM RECURSO À LINHA CELULAR ERA CALUX

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES (VER TAMBÉM INTRODUÇÃO GERAL)

1. O ensaio de transativação do ERα CASX utiliza a linha celular humana U2OS para detetar atividade estrogénica agonista e antagonista mediada através do recetor alfa de estrogénio humano (hERα). O estudo de validação do bioensaio do ERα CALUX estavelmente transfetado pela BioDetection Systems BV (Amesterdão, Países Baixos) demonstrou a adequação e a fiabilidade do ensaio para o fim a que se destina (1). A linha celular ERá CALUX expressa apenas ERá humano transfetado de forma estável (2) (3).

2. Este ensaio foi especificamente concebido para detetar o transativação mediada pelo hERα tendo a medição da bioluminescência como parâmetro. A utilização da bioluminescência é habitualmente utilizada nos bioensaios devido à elevada relação sinal/ruído (4).

3. Foram comunicadas concentrações de fitoestrogénios superiores a 1 μM que sobreativam o gene repórter da luciferase, o que resultou em luminescência não mediada pelo recetor (5) (6) (7). Por conseguinte, concentrações mais elevadas de fitoestrogénios ou de outros compostos semelhantes que podem sobreativar a expressão da luciferase devem ser cuidadosamente examinadas nos ensaios de transativação em ER transfetados de forma estável (ver apêndice 2).

4. Devem ler-se a «INTRODUÇÃO GERAL» e os «COMPONENTES DO ENSAIO ER TA» antes de utilizar este ensaio para fins normativos. As definições e abreviaturas utilizadas no presente método de ensaio são descritas no apêndice 1.

PRINCÍPIO DO ENSAIO (VER TAMBÉM INTRODUÇÃO GERAL)

5. O bioensaio é utilizado para avaliar a ligação do ligando ao ER e subsequente translocação do complexo recetor-ligando para o núcleo. No núcleo, o complexo recetor-ligando fixa-se a elementos de resposta específicos do ADN e transativa um gene repórter da luciferase do pirilampo, que provoca um aumento da expressão celular da enzima luciferase. Após a adição do substrato luciferina da luciferase, a luciferina é transformada num produto bioluminescente. A luz produzida pode ser facilmente detetada e quantificada com o auxílio de um luminómetro.

6. O sistema de ensaio utiliza células ERα CALUX transfetadas de forma estável. As células ERα CALUX são provenientes da linha celular U2OS do osteossarcoma osteoblástico humano. As células humanas U2OS foram estavelmente transfetadas com 3xHRE-TATA-Luc e pSG5-neo-hERα pelo método de coprecipitação com fosfato de cálcio. A linha celular U2OS foi selecionada como a melhor candidata a funcionar como linha celular repórter que responde a estrogénios (e a outras hormonas esteroides), com base na observação de que revelou pouca ou nenhuma atividade recetora endógena. A ausência de recetores endógenos foi avaliada com recurso unicamente a repórteres da luciferase plasmídeos, que não revelaram nenhuma atividade após a adição de ligandos aos recetores. Além disso, esta linha celular suportou respostas fortes mediadas por hormonas quando foram transitoriamente introduzidos recetores cognatos (2) (3) (8).

7. O ensaio de produtos químicos para atividade estrogénica ou antiestrogénica com recurso à linha celular ERα CALUX inclui ume várias séries de ensaios completas. Durante a série de ensaios de avaliação prévia, são determinadas a solubilidade, a citotoxicidade e uma gama de concentrações mais pormenorizada dos produtos químicos em estudo, com vista à realização de ensaios

▼M8

completos. Durante as séries completas, as gamas de concentração mais pormenorizada dos produtos químicos em estudo são ensaiadas nos bioensaios ERα CALUX, seguidas da classificação dos produtos químicos em estudo para agonismo ou antagonismo.

8. Os critérios para a interpretação dos dados são descritos em pormenor no ponto 59. Em suma, um produto químico em estudo é considerado positivo para agonismo se, pelo menos, duas concentrações consecutivas do produto apresentarem uma resposta igual ou superior a 10 % da resposta máxima do padrão de referência, 17β-estradiol (PC_{10}). Um produto químico em estudo é considerado positivo para antagonismo se, pelo menos, duas concentrações consecutivas do produto químico em estudo apresentarem uma resposta igual ou inferior a 80 % da resposta máxima do padrão de referência, tamoxifeno (PC_{80}).

PROCEDIMENTO

Linhas celulares

9. Para o ensaio, deve ser utilizada a linha celular U2OS ERα CALUX transfetada de forma estável. A linha celular pode ser obtida na BioDetection Systems BV, Amesterdão, Países Baixos, através de um acordo de licença técnica.

10. Devem utilizar-se apenas culturas de células livres de micoplasmas. Os lotes de células utilizados devem ser certificados como negativos para contaminação por micoplasmas ou deve proceder-se à realização de um ensaio de micoplasmas antes da sua utilização. Deve usar-se a RT-PCR (reação em cadeia da polimerase em tempo real) para deteção sensível de infeção por micoplasmas (9).

Estabilidade da linha celular

11. Para manter a sua estabilidade e integridade, as células CALUX devem ser armazenadas em azoto líquido (-80 °C). Após o descongelamento para iniciar uma nova cultura, as células devem ser subcultivadas, pelo menos, duas vezes antes de serem utilizadas para avaliar a atividade estrogénica agonista e antagonista dos produtos químicos. As células não devem ser subcultivadas por mais de 30 passagens.

12. Para monitorizar a estabilidade da linha celular ao longo do tempo, deve verificar-se a capacidade de resposta do sistema de ensaio agonístico e antagonístico, através da avaliação do EC_{50} ou do IC_{50} do padrão de referência. Além disso, é necessário monitorizar a indução relativa da amostra de controlo positivo (PC) e da amostra de controlo negativo (NC). Os resultados devem estar de acordo com os critérios de aceitação para o bioensaio ERα CALUX antagonístico (quadro 3C) ou antagonístico (quadro 4C). Os padrões de referência e os controlos positivo e negativo são apresentados no quadros 1 e no quadro 2 para os modos agonístico e antagonístico, respetivamente.

Cultura celular e condições de colocação em placa

13. As células U2OS são cultivadas em meio de crescimento (DMEM/F12 (1:1) com vermelho de fenol (indicador de pH), complementado com soro fetal bovino (7,5 %), aminoácidos não essenciais (1 %), 10 unidades/ml de penicilina, estreptomicina e geneticina (G-418), marcadores de seleção. As células devem ser colocadas numa incubadora de CO_2 (5 % de CO_2) a 37 °C e com 100 % de humidade. Quando atingirem uma confluência de 85-95 %, devem ser subcultivadas ou preparadas para sementeira em placas de microtitulação com 96 poços. Neste último caso, devem ser ressuspensas em 1×10^5 células/ml em meio de ensaio isento de estrogénio – DMEM/F12 (1:1) sem vermelho de fenol, complementado com soro fetal bovino tratado com carvão revestido de dextrano (5 % v/v), aminoácidos não essenciais (1 % v/v) e 10 unidades/ml de penicilina e estreptomicina) e colocadas nos poços das placas de microtitulação de 96 poços (100 µl de suspensão celular homogeneizada). As células devem ser pré-incubadas numa incubadora de CO_2 (5 % CO_2, 37 °C, 100 % de humidade) durante 24 horas antes da exposição. O material de plástico deve ser isento de estrogénio.

▼M8

Critérios de aceitabilidade

14. As atividades agonísticas e antagonístas do(s) produto(s) químico(s) em estudo são ensaiadas em série de ensaios. Uma série de ensaios é constituída por um máximo de 6 placas de microtitulação. Cada série de ensaios contém pelo menos 1 série completa de diluições de um padrão de referência, uma amostra de controlo positivo, uma amostra de controlo negativo e solvente. As figuras 1 e 2 apresentam a configuração das placas para as séries de ensaios agonísticas e antagonísticas.

15. Todas as diluições dos padrões de referência, dos produtos químicos em estudo, dos controlos do solvente e dos controlos positivo e negativo devem ser analisadas em triplicado. Todas as análises em triplicado devem satisfazer os requisitos indicados nos quadros 3A e 4A.

16. Em cada série de ensaios, é medida, na primeira placa, uma série completa de diluições do padrão de referência (17β-estradiol para agonismo; tamoxifeno para antagonismo). Para ser possível comparar os resultados da análise das restantes 5 microplacas com a primeira placa de microtitulação – que tem a curva concentração-resposta completa do padrão de referência –, todas as placas deverão conter 3 amostras de controlo: controlo do solvente, a mais elevada concentração do padrão de referência ensaiado e a concentração aproximada de EC_{50} (agonismo) ou IC_{50} (antagonismo) do padrão de referência. O rácio da média das amostras de controlo na primeira placa e das 5 restantes deve cumprir os requisitos indicados no quadro 3C (agonismo) ou no quadro 4C (antagonismo).

17. Para cada placa de microtitulação de série de ensaios, calcula-se o fator z (10) utilizando as respostas à concentração mais elevada e mais baixa do padrão de referência. Uma placa de microtitulação é considerada válida se preencher os requisitos constantes do quadro 3C (agonismo) ou do quadro 4C (antagonismo).

18. O padrão de referência deve produzir uma curva sigmoidal dose-resposta. Os EC_{50} ou IC_{50} derivados da resposta da série de diluições do padrão de referência devem cumprir os requisitos indicados no quadro 3C (agonismo) ou no quadro 4C (antagonismo).

19. Cada série de ensaios deve abranger uma amostra de controlo positivo e uma amostra de controlo negativo. A indução relativa calculada da amostra de controlo positivo e da amostra de controlo negativo deve satisfazer os requisitos indicados no quadro 3C (agonismo) ou no quadro 4C (antagonismo).

20. Durante todas as medições, o fator de indução da mais elevada concentração do padrão de referência deve ser medido dividindo a resposta média da unidade de luz relativa (RLU) mais elevada do padrão de referência, 17β--estradiol, pela resposta de controlo RLU média do solvente de referência. Este fator de indução deve cumprir os requisitos mínimos relativos ao fator de indução prescrito no quadro 3C (agonismo) ou no quadro 4C (antagonismo).

21. Só são consideradas válidas as placas de microtitulação que satisfaçam todos os critérios de aceitação acima mencionados e possam ser utilizadas para avaliar a resposta do produto químico em estudo.

22. Os critérios de aceitação são aplicáveis tanto a séries de ensaios prévios como a séries de ensaios completas.

▼M8

Quadro 1

Concentrações do padrão de referência, controlo positivo (PC) e controlo negativo (NC) para o bioensaio agonístico CALUX

	Substância	N.º CAS	Intervalo de ensaio (M)
Padrão de referência	17β-Estradiol	50-28-2	$1*10^{-13}$ - $1*10^{-10}$
Controlo positivo (PC)	17α-Metiltestosterona	58-18-4	$3*10^{-06}$
Controlo negativo (NC)	Corticosterona	50-22-6	$1*10^{-08}$

Quadro 2

Concentrações do padrão de referência, controlo positivo (PC) e controlo negativo (NC) para o bioensaio antagonístico CALUX

	Substância	N.º CAS	Intervalo de ensaio (M)
Padrão de referência	Tamoxifeno	10540-29-1	$3*10^{-9}$ - $1*10^{-5}$
Controlo positivo (PC)	4-Hidroxitamoxifeno	68047-06-3	$1*10^{-9}$
Controlo negativo (NC)	Resveratrol	501-36-0	$1*10^{-5}$

Quadro 3

Critérios de aceitação para o bioensaio agonístico ERα CALUX

A - amostras individuais numa placa		**Critério**
1	% DP máximo dos poços triplicados (para NC, PC, cada diluição do produto químico em estudo e o padrão de referência, exceto C0)	< 15 %
2	% DP máximo dos poços triplicados [para o padrão de referência e para os controlos do solvente do produto químico em estudo (C0, SC)]	< 30 %
3	Fuga máxima de LDH, como medida de citotoxicidade.	< 120 %
B - numa única placa de microtitulação		
4	Relação entre o controlo do solvente do padrão de referência (C0; placa 1) e o controlo do solvente do produto químico em estudo (SC; placas 2 a x),	0,5 a 2,0
5	Relação entre as concentrações mais elevadas aprox. de EC_{50} e do padrão de referência na placa 1 e as concentrações mais elevadas aprox. de EC_{50} e do padrão de referência nas placas 2 a x (C4, C8)	0,70 a 1,30
6	Fator Z de cada placa	> 0,6
C - numa única série de análises (todas as placas de uma série)		
7	Curva sigmoidal dos padrões de referência	Sim (17ß-estradiol)
8	Gama EC_{50} para o padrão de referência (17ß-estradiol)	4*10-12 – 4*10-11 M
9	Fator de indução mínimo da concentração mais elevada de 17ß-estradiol, em relação ao controlo de solvente do padrão de referência.	5
10	(%) PC indução relativa.	> 30 %
11	(%) NC indução relativa	< 10 %

▼M8

Aprox.: aproximado; PC: controlo positivo; NC: controlo negativo; SC: controlo de solvente do produto químico em estudo; C0: controlo de solvente do padrão de referência; DP: desvio-padrão; DHL: desidrogenase láctica

Quadro 4

Critérios de aceitação para o bioensaio antagonístico ERα CALUX

A - amostras individuais numa placa		**Critério**
1	% DP máximo dos poços triplicados (para NC, PC, cada diluição do produto químico em estudo e o controlo do solvente (C0) do padrão de referência)	< 15 %
2	% DP máximo dos poços triplicados (para o controlo do veículo (VC) e para a concentração máxima do padrão de referência (C8))	< 30 %
3	Fuga máxima de LDH, como medida de citotoxicidade.	< 120 %
B - numa única placa de microtitulação		
4	Relação entre o controlo de solvente do padrão de referência mais elevadas e o controlo de solvente do produto químico de ensaio (SC; placas 2 a x)	0,70 a 1,30
5	Relação entre as concentrações aprox. de IC_{50} e do padrão de referência na placa 1 e as concentrações aprox. de IC_{50} e do padrão de referência nas placas 2 a x (C4)	0,70 a 1,30
6	Relação entre as concentrações mais elevadas do padrão de referência na placa 1 e as concentrações mais elevadas do padrão de referência nas placas 2 a x (C8)	0,50 a 2,0
7	Fator Z de cada placa	> 0,6
C - numa única série de análises (todas as placas de uma série)		
8	Curva sigmoidal dos padrões de referência	Sim (tamoxifeno)
9	Gama IC_{50} do padrão de referência (tamoxifeno)	1*10-8 - 1*10--7 M
10	Fator de indução mínimo do controlo de solvente do padrão de referência em relação à concentração mais elevada de tamoxifeno.	2,5
11	(%) PC indução relativa.	< 70 %
12	(%) NC indução relativa	> 85 %

Aprox.: aproximativo; PC: controlo positivo; NC: controlo negativo; VC: controlo do veículo (controlo do solvente sem concentração fixa do padrão de referência agonista); SC: controlo de solvente do produto químico em estudo; C0: controlo de solvente do padrão de referência; DP: desvio padrão; DHL: desidrogenase lática

Controlo do solvente/veículo, padrões de referência, controlos positivos, controlos negativos

23. Tanto na série de ensaios prévios como na série de ensaios completas deve utilizar-se os mesmos controlos do solvente/veículo, padrões de referência, controlos positivos e controlos negativos. Além disso, a concentração dos padrões de referência, dos controlos positivos e dos controlos negativos deve ser a mesma.

▼**M8**

Controlo do solvente

24. O solvente utilizado para dissolver os produtos químicos em estudo deve ser ensaiado como solvente de controlo. O dimetilsulfóxido (DMSO 1 % (v/v); N.º CAS 67-68-5) foi utilizado como veículo durante a validação do bioensaio ERα CALUX. Se for utilizado um solvente que não seja o DMSO, devem ser ensaiados no mesmo veículo todos os padrões de referência, controlos e produtos químicos em estudo. Note-se que o controlo do solvente para estudos antagonistas contém uma concentração fixa do padrão de referência agonista, 17β-estradiol (aproximadamente a concentração EC_{50}). Para ensaiar o solvente utilizado nos estudos antagonísticos, deve ser preparado e ensaiado um controlo do veículo.

Controlo do veículo (antagonismo)

25. Para o ensaio do antagonismo, completa-se o meio com uma concentração fixa do padrão de referência agonista, 17β-estradiol (aproximadamente a concentração EC_{50}). Para ensaiar o solvente utilizado para dissolver o produto químico em estudo, deve preparar-se um meio de ensaio sem uma concentração fixa do padrão de referência agonista (17β-estradiol). Esta amostra de controlo é indicada como o controlo do veículo. O dimetilsulfóxido [DMSO 1 % (v/v); n.º CAS 67-68-5] foi utilizado como veículo durante a validação do bioensaio ERα CALUX. Se for utilizado um solvente que não seja o DMSO, devem ser ensaiados no mesmo veículo todos os padrões de referência, controlos e produtos químicos em estudo.

Padrões de referência

26. O padrão de referência agonístico é o 17β-estradiol (quadro 1). Os padrões de referência incluem uma série de diluições de oito concentrações de 17β-estradiol ($1*10^{-13}$, $3*10^{-13}$, $1*10^{-12}$, $3*10^{-12}$, $6*10^{-12}$, $1*10^{-11}$, $3*10^{-11}$, $1*10^{-10}$ M).

27. O padrão de referência antagonístico é o tamoxifeno (quadro 2). Os padrões de referência incluem uma série de diluições de oito concentrações de tamoxifeno ($3*10^{-09}$, $1*10^{-08}$, $3*10^{-08}$, $1*10^{-07}$, $3*10^{-07}$, $1*10^{-06}$, $3*10^{-06}$, $1*10^{-05}$ M). Cada uma das concentrações do padrão de referência antagonístico é coincubada com uma concentração fixa do padrão de referência agonístico 17β-estradiol ($3*10^{-12}$ M).

Controlo positivo

28. No caso de estudos agonísticos, o controlo positivo é a 17α-metiltestosterona (quadro 1).

29. O controlo positivo para os estudos antagonísticos é o 4-hidroxitamoxifeno (quadro 2). O controlo positivo antagonístico é coincubado com uma concentração fixa do padrão de referência agonístico, 17β-estradiol ($3*10^{-12}$ M).

Controlo negativo

30. O controlo negativo para os estudos agonísticos é a corticosterona (quadro 1).

31. O controlo negativo para os estudos antagonísticos é o resveratrol (quadro 2). O controlo negativo antagonístico é coincubado com uma concentração fixa do padrão de referência agonístico, 17β-estradiol ($3*10^{-12}$ M).

▼M8

Demonstração da competência técnica do laboratório (ver pontos 14 e os quadros 3 e 4 da secção «COMPONENTES DO ENSAIO ER TA» do presente método)

Veículo

32. O solvente utilizado para dissolver o produto químico em estudo deve solubilizá-lo completamente e ser miscível com o meio celular. O DMSO, a água e o etanol (pureza 95 % a 100 %) são solventes adequados. Caso seja utilizado DMSO como solvente, a sua concentração máxima durante a incubação não deve exceder 1 % (v/v). Antes da utilização, o solvente deve ser ensaiado para verificar a ausência de citotoxicidade e de interferência com o desempenho do ensaio.

Preparação de padrões de referência, dos controlos positivos, dos controlos negativos e dos produtos químicos em estudo

33. Os padrões de referência, os controlos positivos, os controlos negativos e o produto químico em estudo são dissolvidos em DMSO a 100 %, ou num solvente adequado. Devem em seguida ser preparadas diluições adequadas (em série) no mesmo solvente. Antes da dissolução, todas as substâncias devem poder estabilizar à temperatura ambiente. As soluções recentemente preparadas dos padrões de referência, controlos positivos, controlos negativos e produtos químicos em estudo não devem apresentar precipitados nem turbidez percetíveis. O padrão de referência e os controlos podem ser preparados a granel. As soluções de produtos químicos em estudo devem ser preparadas antes de cada ensaio. As diluições finais dos padrões de referência, dos controlos positivos, dos controlos negativos e do produto químico em estudo devem ser preparadas para cada experiência e utilizadas nas 24 horas seguintes à preparação.

Solubilidade, citotoxicidade e determinação da gama.

34. Durante a série de ensaios de avaliação prévia, é determinada a solubilidade do produto químico em estudo no solvente escolhido. Prepara-se uma concentração máxima de 0,1 M. No caso de esta concentração mostrar problemas de solubilidade, devem preparar-se soluções de concentração mais baixa até os produtos químicos serem completamente solubilizados. Durante a série de ensaios de avaliação prévia, são ensaiadas diluições em série de 1:10 do produto químico em estudo. A concentração máxima de ensaio agonistas ou antagonistas é de 1 mM. Após a série de ensaios de avaliação prévia, é derivada uma gama de concentração pormenorizada para produtos químicos em estudo que deve ser ensaiada durante as séries de ensaios completos. As diluições utilizadas para os ensaios completos devem ser 1×, 3×, 10×, 30×, 100×, 300×, 1000× e 3000×.

35. O ensaio de citotoxicidade está incluído no protocolo de ensaio agonista e antagonista (11). O ensaio de citotoxicidade é integrado tanto na série de ensaios de avaliação prévia como na série de ensaios completos. O método utilizado para avaliar a citotoxicidade durante a validação do bioensaio ERα CALUX foi o ensaio de fugas da desidrogenase láctica (LDH) em combinação com a inspeção visual qualitativa das células (ver apêndice 4.1) após a exposição aos produtos químicos em estudo. No entanto, podem utilizar-se outros métodos quantitativos para a determinação da citotoxicidade (por exemplo, ensaio colorimétrico à base de tetrazólio – MTT – ou bioensaio de citotoxicidade CALUX). Em geral, as concentrações do produto químico em estudo que apresentem uma redução da viabilidade celular superior a 20 % são consideradas citotóxicas e não podem, portanto, ser utilizadas na avaliação dos dados. No que respeita ao ensaio de fuga de LDH, a concentração do produto químico em estudo é considerada citotóxica se a percentagem de LDH for superior a 120 %.

▼M8

Exposição ao produto químico em estudo e a organização da placa do ensaio

36. Após a tripsinização de um balão confluente de células de cultura, as células voltam a ser suspensas em 1×10^5 células/ml num meio de ensaio isento de estrogénio. Colocam-se 100 µl de células ressuspensas nos poços interiores de uma placa de microtitulação com 96 poços. Os poços exteriores são preenchidos com 200 µl de solução salina tamponada de fosfato (PBS) (ver figuras 1 e 2). As células colocadas nas placas são pré-incubadas durante 24 horas numa incubadora de CO_2 (5 % de CO_2, 37 °C, 100 % de humidade).

37. Após a pré-incubação, as placas são inspecionadas para verificação da citotoxicidade visual (ver apêndice 4.1), da contaminação e da confluência. Para o ensaio, apenas são utilizadas placas que não apresentem citotoxicidade ou contaminação e tenham uma confluência mínima de 85 %. O meio dos poços interiores é cuidadosamente removido e substituído por 200 µl de meio de ensaio sem estrogénio com as diluições adequadas dos padrões de referência, produtos químicos em estudo, controlos positivos, controlos negativos e controlos de solvente (quadro 5: estudos de agonistas; quadro 6: estudos de antagonista). Todos os padrões de referência, produtos químicos em estudo, controlos positivos, controlos negativos e controlos dos solventes são ensaiados em triplicado. Na figura 1, é apresentada a configuração das placas para os ensaios de agonistas. Na figura 2, é apresentada a configuração da placa para os ensaios de antagonistas. A configuração da placa para os ensaios de avaliação prévia e para os ensaios completos é idêntica. No caso dos ensaios antagonísticos, todos os poços interiores, exceto os poços do controlo do veículo (VC), contêm igualmente uma concentração fixa do padrão de referência agonista, 17β-estradiol ($3*10^{-12}$ M). Note-se que os padrões de referência C8 e C4 devem ser adicionados a todas as placas de TC.

38. Após a exposição das células a todos os produtos químicos, as placas de microtitulação de 96 poços devem ser incubadas por mais 24 horas numa incubadora de CO_2 (5 % CO_2, 37 °C, 100 % de humidade).

Figura 1

Configuração das placas de microtitulação de 96 poços para avaliação prévia e avaliação do efeito agonístico

Placa 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
C		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
D		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
E		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
F		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
G		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
H												

Placas subsequentes

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (máx)	
C		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (máx)	
D		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (máx)	
E		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC_{50})	
F		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC_{50})	
G		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC_{50})	
H												

C0 = Solvente padrão de referência.

C(1-8) = Série de diluições (1-8, da concentração mais baixa para a mais alta) do padrão de referência.

▼**M8**

PC = Controlo positivo.

NC = Controlo negativo.

TCx-(1-8) = Diluições (1-8, da concentração mais baixa para a mais alta) do produto químico em estudo para a série de ensaios de avaliação prévia e para avaliação do efeito agonístico do produto químico x.

SC = Controlo do solvente do produto químico em estudo (idealmente, o mesmo solvente de C0, mas eventualmente de outro lote).

Células cinzentas: = Poços exteriores, preenchidos com 200 µl de PBS.

Figura 2

Configuração das placas de microtitulação de 96 poços para avaliação antagonística prévia e avaliação do efeito antagonístico

Placa 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
C		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
D		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
E		NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
F		NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	1-7	TC1-	PC	
G		NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
H												

Placas subsequentes

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (máx)	
C		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (máx)	
D		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (máx)	
E		C4 (IC_{50})	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (máx)	
F		C4 (IC_{50})	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (máx)	
G		C4 (IC_{50})	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (máx)	
H												

C0 = Solvente padrão de referência.

C(1-8) = Série de diluições (1-8, da concentração mais baixa para a mais alta) do padrão de referência.

NC = Controlo negativo.

PC = Controlo positivo.

TCx-(1-8) = Diluições (1-8, da concentração mais baixa para a mais alta) do produto químico em estudo para a série de ensaios de avaliação prévia e para avaliação do efeito antagonístico do produto químico x.

SC = Controlo do solvente do produto químico em estudo (idealmente, o mesmo solvente de C0, mas eventualmente de outro lote).

VC = Controlo do veículo (controlo do solvente sem concentração fixa do padrão de referência agonista 17β-estradiol).

Células cinzentas: = Poços exteriores, preenchidos com 200 µl de PBS.

Nota: todos os poços interiores, exceto os poços do controlo do veículo (VC), contêm igualmente uma concentração fixa do padrão de referência agonista, 17β--estradiol (3,0*10-12 M)

Medição da luminescência

39. A medição da luminescência é descrita em pormenor no protocolo de ensaio relativo ao agonista e ao antagonista (10). O meio dos poços deve ser removido e as células devem ser lisadas após 24 horas de incubação, de modo a abrirem a membrana celular e permitirem a medição da atividade da luciferase.

▼M8

40. Para medir a luminescência, este procedimento exige um luminómetro equipado com dois injetores. A reação da luciferase é desencadeada por injeção do substrato luciferino. A reação é interrompida por adição de 0,2 M NaOH, por forma a impedir a transferência de luminescência de um poço para outro.

41. A luz emitida por cada poço é expressa em unidades de luz relativa (RLU) por poço.

Série de ensaios de avaliação prévia

42. Os resultados das análises prévias são utilizados para determinar um intervalo de concentração mais preciso de produtos químicos em estudo, com vista à realização dos ensaios completos. A avaliação dos resultados das análises prévias e a determinação da gama de concentrações mais precisa de produtos químicos em estudo para ensaios completos é descrita de forma aprofundada no protocolo de ensaio de agonistas e antagonistas (10). Apresenta-se aqui um breve resumo dos procedimentos de determinação da gama de concentrações dos produtos químicos em estudo para os ensaios agonista e antagonista. Ver os quadros 5 e 6 para diretrizes para a conceção da diluição em série.

Seleção das concentrações para avaliação de efeitos agonísticos

43. Durante a série de ensaios de avaliação prévia, os produtos químicos em estudo devem ser ensaiados com a série de diluições indicada nos quadros 5 (agonismo) e 6 (antagonismo). Todas as concentrações devem ser ensaiadas em triplicado, de acordo com a configuração da placa indicada nas figuras 1 (agonismo) ou 2 (antagonismo).

44. Apenas os resultados de análises que satisfaçam os critérios de aceitação (quadro 3) são considerados válidos e podem ser utilizados para avaliar a resposta dos produtos químicos em estudo. Se uma ou mais placas de microtitulação de uma série de análises não cumprirem os critérios de aceitação, as placas de microtitulação correspondentes devem ser reanalisadas. Caso a primeira placa com a série completa de diluições do padrão de referência não cumpra os critérios de aceitação, a série completa de ensaios (6 placas) tem de ser repetida.

45. As gamas de concentração inicial dos produtos químicos em estudo devem ser ajustadas e a série de ensaios de avaliação prévia repetida no caso de:

— se observar citotoxicidade. O procedimento de avaliação prévia deve ser repetido com concentrações não citotóxicas mais baixas do produto químico em estudo;

— a avaliação prévia do produto químico em estudo não produzir uma curva dose-resposta completa, porque as concentrações ensaiadas geram indução máxima. Repete-se a série de ensaios de avaliação prévia com concentrações menores do produto químico em estudo.

46. Quando se observa uma resposta válida relacionada com a dose, deve selecionar-se a menor concentração à qual é observada a indução máxima sem revelar citotoxicidade. A concentração mais elevada do produto químico em estudo nas séries de ensaios completos deve ser 3 vezes superior a esta concentração selecionada.

47. Deve preparar-se uma série completa de diluições mais precisas do produto químico em estudo com as etapas de diluição indicadas no quadro 5, começando pela concentração mais alta determinada *supra*.

▼M8

48. Um produto químico em estudo que não provoque qualquer efeito antagonista deve ser ensaiado nas séries de ensaio completas, começando com a concentração não citotóxica mais alta identificada na série de ensaios de avaliação prévia.

Seleção das concentrações para avaliação dos efeitos antagónicos

49. Apenas os resultados de análises que satisfaçam os critérios de aceitação (quadro 4) são considerados válidos e podem ser utilizados para avaliar a resposta dos produtos químicos em estudo. Se uma ou mais placas de microtitulação de uma série de análises não cumprirem os critérios de aceitação, devem ser reanalisadas. Caso a primeira placa com a série completa de diluições do padrão de referência não cumpra os critérios de aceitação, a série completa de ensaios (6 placas) tem de ser repetida.

50. As gamas de concentração inicial dos produtos químicos em estudo devem ser ajustadas e a série de ensaios de avaliação prévia repetida no caso de:

— se observar citotoxicidade. O procedimento de avaliação prévia deve ser repetido com concentrações não citotóxicas mais baixas do produto químico em estudo;

— a avaliação prévia do produto químico em estudo não produzir uma curva dose-resposta completa, porque as concentrações ensaiadas geram inibição máxima. Deve repetir-se a série de ensaios de avaliação prévia com concentrações menores do produto químico em estudo.

51. Quando se observa uma resposta válida relacionada com a dose, deve selecionar-se a menor concentração à qual é observada a inibição máxima sem revelar citotoxicidade. A concentração mais elevada do produto químico em estudo nas séries de ensaios completos deve ser 3 vezes superior a esta concentração selecionada.

52. Deve preparar-se uma série completa de diluições mais precisas do produto químico em estudo com as etapas de diluição indicadas no quadro 6, começando pela concentração mais alta determinada *supra*.

53. Um produto químico em estudo que não provoque qualquer efeito antagonista deve ser ensaiado nas séries de ensaio completas, começando com a concentração não citotóxica mais alta ensaiada na série de ensaios de avaliação prévia.

Séries de ensaios completos

54. Após a seleção das gamas de concentração aperfeiçoadas, os produtos químicos em estudo devem ser submetidos a um ensaio completo, utilizando a série de diluições indicada no quadro 5 (agonismo) e 6 (antagonismo). Todas as concentrações devem ser ensaiadas em triplicado, de acordo com a configuração da placa indicada nas figuras 1 (agonismo) ou 2 (antagonismo).

55. Apenas os resultados de análises que satisfaçam os critérios de aceitação (quadros 3 e 4) são considerados válidos e podem ser utilizados para avaliar a resposta dos produtos químicos em estudo. Se uma ou mais placas de microtitulação de uma série de análises não cumprirem os critérios de aceitação, devem ser reanalisadas. Caso a primeira placa contendo a série completa de diluições do padrão de referência não cumpra os critérios de aceitação, a série completa de ensaios (6 placas) tem de ser repetida.

▼**M8**

Quadro 5

Concentração e diluições dos padrões de referência, controlos e produtos químicos em estudo utilizados nos ensaios agonistas

17β-estradiol de referência		TCx - série de ensaios de avaliação prévia		TCx - série de ensaios completos		Controlos	
conc. (M)		diluição		diluição		conc. (M)	
C0	0	TCx-1	10 000 000 x	TCx-1	3 000 x	PC	$3*10^{-6}$
C1	$1*10^{-13}$	TCx-2	1 000 000 x	TCx-2	1 000 x	NC	$1*10^{-8}$
C2	$3*10^{-13}$	TCx-3	100 000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	$1*10^{-12}$	TCx-4	10 000 x	TCx-4	100 x	SC	0
C4	$3*10^{-12}$	TCx-5	1 000 x	TCx-5	30 x		
C5	$6*10^{-12}$	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x		
C6	$1*10^{-11}$	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x		
C7	$3*10^{-11}$	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x		
C8	$1*10^{-10}$						

TCx - Produto químico em estudo x
PC - Controlo positivo (17α-metiltestosterona)
NC - Controlo negativo (corticosterona)
C0 - Controlo do solvente padrão de referência
SC - Controlo do solvente do produto químico em estudo

▼**M8**

Quadro 6

Concentração e diluições dos padrões de referência, controlos e produtos químicos em estudo utilizados nos ensaios antagonistas

Tamoxifeno de referência		TCx - série de ensaios de avaliação prévia		TCx - série de ensaios completos		Controlos	
conc. (M)		diluição		diluição		conc. (M)	
C0	0	TCx-1	10 000 000 x	TCx-1	3 000 x	PC	$1*10^{-9}$
C1	$3*10^{-9}$	TCx-2	1 000 000 x	TCx-2	1 000 x	NC	$1*10^{-5}$
C2	$1*10^{-8}$	TCx-3	100 000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	$3*10^{-8}$	TCx-4	10 000 x	TCx-4	100 x	SC	0
C4	$1*10^{-7}$	TCx-5	1 000 x	TCx-5	30 x		
C5	$3*10^{-7}$	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x	**Agonista complementado**	
C6	$1*10^{-6}$	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x	**conc. (M)**	
C7	$3*10^{-6}$	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x	17β-estradiol	$3*10^{-12}$
C8	$1*10^{-5}$						

TCx - Produto químico em estudo x
PC - Controlo positivo (4-hidroxitamoxafeno)
NC - Controlo negativo (resveratrol)
C0 - Controlo do solvente padrão de referência
SC - Controlo do solvente do produto químico em estudo
VC - Controlo do veículo (não contém uma concentração fixa do padrão de referência agonístico, 17β-estradiol ($3*10^{-12}$ M).

▼M8

Recolha e análise de dados

56. Após a série de ensaios de avaliação prévia e a série de ensaios completos, devem ser determinados os valores EC_{10}, EC_{50}, PC_{10}, PC_{50} e de indução máxima ($TCx_{máx}$) de um produto químico em estudo para o ensaio agonístico. Para este último, devem ser calculados os valores de IC_{20}, IC_{50}, PC_{80}, PC_{50} e de indução mínima (TCx_{min}). Nas figuras 3 (agonismo) e 4 (antagonismo), apresenta-se uma representação gráfica destes parâmetros. Os parâmetros exigidos são calculados com base na indução relativa de cada produto químico em estudo [relativa à indução máxima do padrão de referência (= 100 %)]. Deve utilizar-se a regressão não linear (declive variável, 4 parâmetros) para a avaliação dos dados, de acordo com a seguinte equação:

$$Y = Base + \frac{(\text{Topo} - \text{Base})}{\{1 + 10^{((lgEC_{50} - X) \times Declive)}\}}$$

em que:

X = Log de dose ou concentração

Y = Resposta [(%) indução relativa]

Topo = (%) indução máxima

Base = (%) indução mínima

$Log(EC_{50})$ = Log da concentração à qual se observam 50 % da resposta máxima

Declive = Declive da curva de Hill

57. Os dados brutos do luminómetro, expressos em unidades de luz relativa (RLU), devem ser transferidos para a folha de cálculo da análise de dados para a série de ensaios de avaliação prévia e a série de ensaios completos. Os dados em bruto devem satisfazer os critérios de aceitação indicados nos quadros 3A e 3B (agonismo) ou 4A e 4B (antagonismo). Caso os dados em bruto satisfaçam os critérios de aceitação, efetuam-se as seguintes etapas de cálculo para determinar os parâmetros exigidos:

Agonistismo

— Subtrair a RLU média do controlo do solvente do padrão referência de cada um dos dados brutos de análise dos padrões de referência.

— Subtrair a RLU média para o controlo do solvente do produto químico em estudo de cada um dos dados de análise brutos dos produtos químicos em estudo.

— Calcular a indução relativa de cada concentração do padrão de referência. Fixar a indução da mais elevada concentração do padrão de referência em 100 %.

— Calcular a indução relativa de cada concentração do produto químico em estudo em relação à concentração mais elevada do padrão de referência e estabelecê-la como 100 %.

— Avaliar os resultados da análise após a regressão não linear (inclinação variável, 4 parâmetros).

▼M8

— Determinar os valores EC_{50} e EC_{10} do padrão de referência.

— Determinar os valores EC_{50} e EC_{10} dos produtos químicos em estudo.

— Determinar a indução relativa máxima do produto químico em estudo ($TC_{máx}$).

— Determinar os valores PC_{10} e PC_{50} dos produtos químicos em estudo.

No caso dos produtos químicos em estudo, pode nem ser sempre obtida uma curva dose-resposta completa devido, por exemplo, a problemas de citotoxicidade ou de solubilidade. Assim, não podem ser determinados os valores EC_{50}, EC_{10} e PC_{50}. Nesse caso, apenas podem ser determinados o PC_{10} e $TC_{máx}$

Antagonismo

— Subtrair a RLU média da concentração mais elevada do padrão de referência de cada um dos dados brutos de análise dos padrões de referência.

— Subtrair a RLU média da concentração mais elevada do padrão de referência de cada um dos dados brutos de análise dos produtos químicos em estudo.

— Calcular a indução relativa de cada concentração do padrão de referência. Fixar a indução da mais baixa concentração do padrão de referência em 100 %.

— Calcular a indução relativa de cada concentração do produto químico em estudo em relação à concentração mais baixa do padrão de referência e estabelecê-la como 100 %.

— Avaliar os resultados da análise após a regressão não linear (inclinação variável, 4 parâmetros).

— Determinar os valores IC_{50} e IC_{20} do padrão de referência.

— Determinar os valores IC_{50} e IC_{20} dos produtos químicos em estudo.

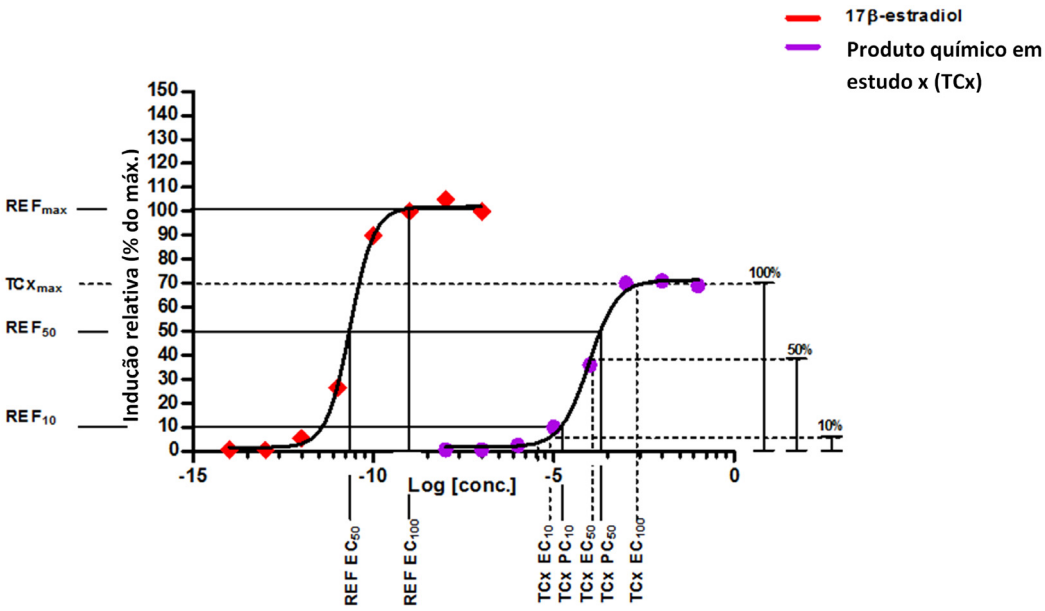
— Determinar a indução relativa mínima do produto químico em estudo ($TC_{mín}$).

— Determinar os valores PC_{80} e PC_{50} dos produtos químicos em estudo.

▼M8

Figura 3

Panorâmica dos parâmetros determinados no ensaio de agonistas



EC_{10} = Concentração de uma substância em que se observam 10 % da sua resposta máxima.

EC_{50} = Concentração de uma substância em que se observam 50 % da sua resposta máxima.

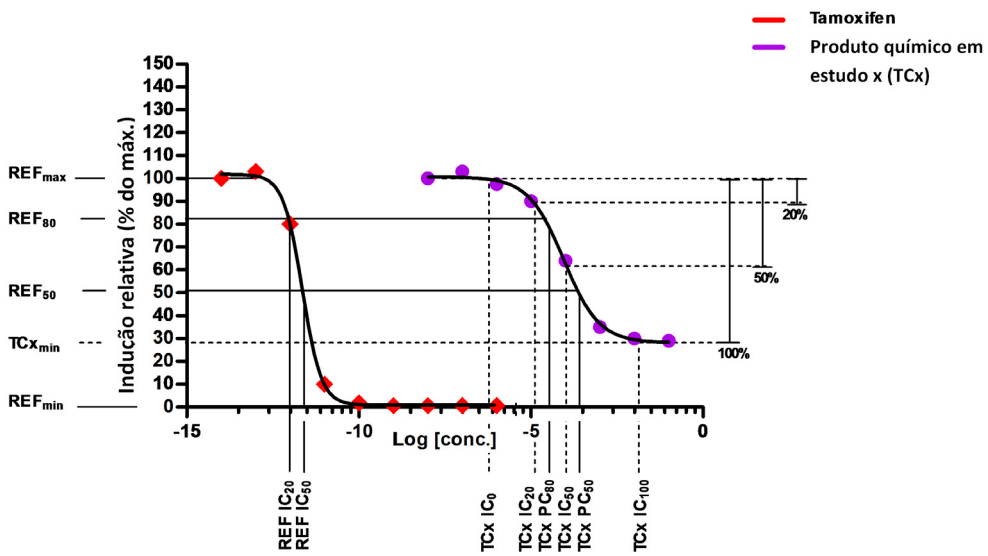
PC_{10} = Concentração de um produto químico em estudo na qual a sua resposta é igual a EC_{10} do padrão de referência.

PC_{50} = Concentração de um produto químico em estudo na qual a sua resposta é igual à EC_{50} do padrão de referência.

$TCx_{máx}$ = Indução máxima relativa do produto químico em estudo.

Figura 4

Panorâmica dos parâmetros determinados no ensaio de antagonistas



IC_{20} = Concentração de uma substância em que se observa 80 % da sua resposta máxima (20 % de inibição).

▼**M8**

IC_{50} = Concentração de uma substância em que se observa 50 % da sua resposta máxima (50 % de inibição).

PC_{80} = Concentração de um produto químico em estudo na qual a sua resposta é igual à IC_{20} do padrão de referência.

PC_{50} = Concentração de um produto químico em estudo na qual a sua resposta é igual à IC_{50} do padrão de referência.

TCx_{min} = Indução relativa mínima do produto químico em estudo.

No caso dos produtos químicos em estudo, pode nem ser sempre obtida uma curva dose-resposta completa devido, por exemplo, a problemas de citotoxicidade ou de solubilidade. Assim, não é possível determinar o IC_{50}, o IC_{20} e o PC_{50}. Nesse caso, só o PC_{20} e a $TC_{mín}$ podem ser determinados.

58. Os resultados devem basear-se em duas (ou três) séries de ensaios independentes. Se duas séries derem resultados comparáveis e, por conseguinte, reprodutíveis, não é necessário realizar uma terceira série de ensaios. Para serem aceitáveis, os resultados devem:

— satisfazer os critérios de aceitabilidade (ver critérios de aceitabilidade, pontos 14-22),

— ser reprodutíveis.

Critérios de interpretação dos dados

59. Para a interpretação dos dados e a decisão sobre se um produto químico é considerado positivo ou negativo, devem ser utilizados os seguintes critérios:

Agonismo

Para cada série completa de ensaios, considera-se **positivo** o produto químico em estudo nos seguintes casos:

1. A $TC_{máx}$ é igual ou superior a 10 % da resposta máxima do padrão de referência (REF_{10}).

2. Pelo menos, duas concentrações consecutivas do produto químico em estudo são iguais ou superiores ao REF_{10}.

Para cada série de ensaios completos, um produto químico em estudo é considerado **negativo** no caso de:

1. A $TC_{máx}$ não exceder 10 % da resposta máxima do padrão de referência (REF_{10}).

2. Menos de duas concentrações do produto químico em estudo serem iguais ou superiores à REF_{10}.

Antagonismo

Para cada série completa de ensaios, considera-se **positivo** o produto químico em estudo nos seguintes casos:

1. A $TC_{mín}$ é igual ou superior a 80 % da resposta máxima do padrão de referência (REF80 = 20 % de inibição).

2. Pelo menos, duas concentrações consecutivas do produto químico em estudo são iguais ou superiores à REF_{10}.

▼**M8**

Para cada série de ensaios completos, um produto químico em estudo é considerado **negativo** no caso de:

1 A $TC_{mín}$ exceder 80 % da resposta máxima do padrão de referência (inibição RF_{80} = 20 % de inibição).

2 Menos de duas concentrações do produto químico em estudo são inferiores ou iguais à REF_{80}.

60. Para caracterizar a potência da resposta positiva de um produto químico em estudo, a magnitude do efeito (agonismo: $TC_{máx}$; antagonismo: $TC_{mín}$) e a concentração em que o efeito ocorre (agonismo: EC_{10}, EC_{50}, PC_{10}, PC_{50}; antagonismo: IC_{20}, IC_{50}, PC_{80}, PC_{50}) devem ser comunicadas.

RELATÓRIO DO ENSAIO

61. Ver ponto 20 dos «COMPONENTES DO ENSAIO ER TA»

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(1) OCDE (2016). Draft Validation report of the (anti-) ERα CALUX bioassay - transactivation bioassay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 240). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris

(2) Sonneveld E, Jansen HJ, Riteco JA, Brouwer A, van der Burg B. (2005). Development of androgen- and estrogen-responsive bioassays, members of a panel of human cell line-based highly selective steroid-responsive bioassays. *Toxicol Sci.* 83(1), 136-148.

(3) Quaedackers ME, van den Brink CE, Wissink S, Schreurs RHMM, Gustafsson JA, van der Saag PT, and van der Burg B. (2001). 4-Hydroxytamoxifen trans-represses nuclear factor-kB Activity in human osteoblastic U2OS cells through estrogen recetor (ER)α and not through ERβ. *Endocrinology* 142(3), 1156-1166.

(4) Thorne N, Inglese J and Auld DS. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology, Chemistry and Biology17(6):646-57.

(5) Escande A, Pillon A, Servant N, Cravedi JP, Larrea F, Muhn P, Nicolas JC, Cavaillès V and Balaguer P. (2006). Evaluation of ligand selectivity using reporter cell lines stably expressing estrogen recetor alpha or beta. *Biochem. Pharmacol.,* 71, 1459-1469.

(6) Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B and Gustafsson JA. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen recetor beta. *Endocrinol.,* 139, 4252-4263.

(7) Sotoca AM, Bovee TFH, Brand W, Velikova N, Boeren S, Murk AJ, Vervoort J, Rietjens IMCM. (2010). Superinduction of estrogen recetor mediated gene expression in luciferase based reporter gene assays is mediated by a post-transcriptional mechanism. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.,* 122, 204–211.

(8) Sonneveld E, Riteco JAC, Jansen HJ, Pieterse B, Brouwer A, Schoonen WG, and van der Burg B. (2006). Comparison of *in vitro* and *in vivo* screening models for androgenic and estrogenic activities. *Toxicol. Sci.,* 89(1), 173–187.

▼**M8**

(9) Kobayashi H, Yamamoto K, Eguchi M, Kubo M, Nakagami S, Wakisaka S, Kaizuka M and Ishii H. (1995). Rapid detection of mycoplasma contamination in cell cultures by enzymatic detection of polymerase chain reaction (PCR) products. *J. Vet. Med. Sci.,* 57(4), 769-771.

(10) Zhang J-H, Chung TDY, and Oldenburg KR. (1999). A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throuphut screening assays. J. Biomol. Scr., 4, 67-73

(11) Besselink H, Middelhof I, and Felzel, E. (2014). Transactivation assay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential using ERα CALUX cells. BioDetection Systems BV (BDS). Amsterdam, the Netherlands.

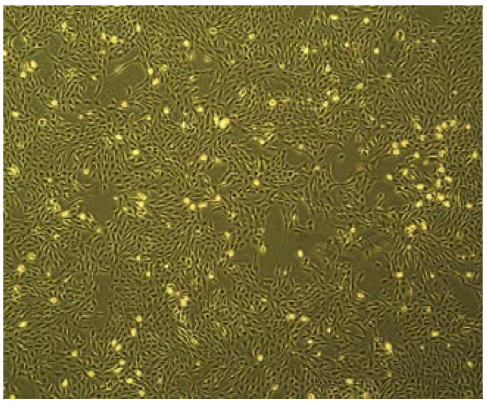
▼**M8**

Apêndice 4.1

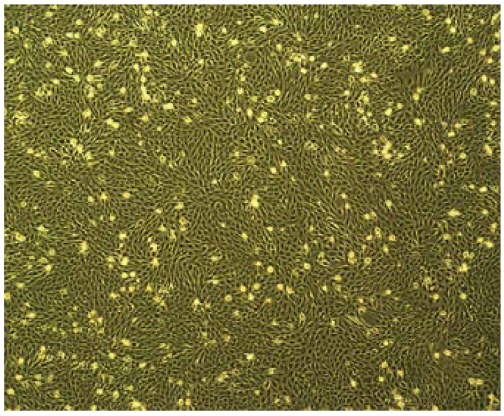
INSPEÇÃO VISUAL DA VIABILIDADE CELULAR



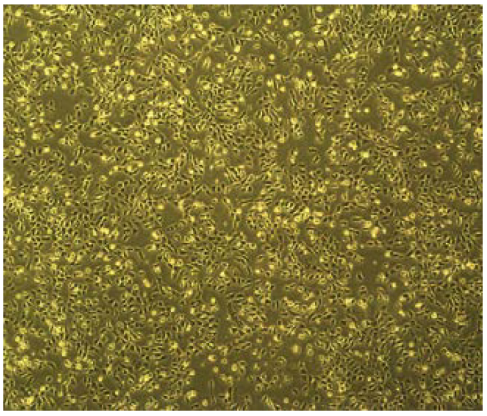
Confluência < 5 %. As células acabaram de ser semeadas. Viabilidade celular: 100 %. Classificação: «sem citotoxicidade»



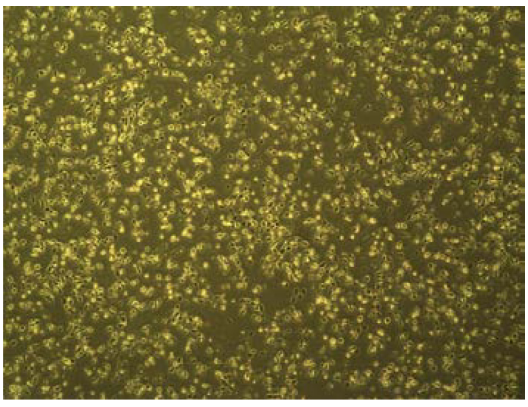
Confluência > 85 %. Nesta fase, as células são expostas aos produtos químicos em estudo. viabilidade celular > 95 %.
Classificação: «sem citotoxicidade»



Confluência > 95 %. A cultura de células é muito densa e começam a crescer demasiado. Viabilidade celular > 95 %.
Classificação: «sem citotoxicidade»



Viabilidade celular < 25 %. As células separam-se; o contacto entre as células diminui. As células são arredondadas. Classificação: «citotoxicidade»



Viabilidade celular < 5 %. As células estão completamente separadas e o contacto entre elas é interrompido. As células são arredondadas. Classificação: «citotoxicidade»

▼M8

B.67. **ENSAIO DE MUTAÇÃO GENÉTICA EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS *IN VITRO* COM O GENE DA TIMIDINA-CINASE**

INTRODUÇÃO

1. O presente método de ensaio é equivalente à *Test Guideline* 490 (2016) da OCDE. Os métodos de ensaio são analisados e revistos periodicamente à luz do progresso científico, das necessidades normativas e do bem-estar dos animais. O ensaio do linfoma do rato (MLA) e o ensaio TK6 com o lócus da timidina-cinase (TK) estavam originalmente incluídos no método de ensaio B.17. Posteriormente, o grupo de trabalho de peritos do AML do International Workshop for Genotoxicity Testing (IWGT) desenvolveu recomendações harmonizadas a nível internacional de critérios de aceitação e interpretação dos dados para o MLA (1)(2)(3)(4)(5), tendo estas recomendações sido incorporadas no novo método de ensaio B.67. O presente método de ensaio foi concebido para o ensaio MLA e, dado que utiliza também o lócus TK, para o ensaio TK6. Embora o MLA tenha sido amplamente utilizado para fins normativos, o TK6 tem sido utilizado com muito menos frequência. Note-se que, apesar da semelhança entre os parâmetros, as duas linhas celulares não são permutáveis e os programas de regulamentação podem manifestar preferência no respeitante a uma determinada utilização regulamentar. Por exemplo, a validação do MLA demonstrou que o método é adequado para detetar não só as mutações genéticas, mas também a capacidade de um produto químico em estudo para induzir danos cromossómicos estruturais. O presente método faz parte de uma série de métodos de ensaio no domínio da toxicologia genética. Está disponível um documento da OCDE que fornece informações sucintas sobre ensaios de toxicologia genética e resume as alterações recentemente introduzidas nas orientações da OCDE neste domínio (6).

2. O objetivo dos ensaios de mutação genética de células de mamíferos *in vitro* é detetar mutações genéticas induzidas por produtos químicos. As linhas celulares utilizadas nestes ensaios indicam mutações em genes repórteres, nomeadamente no gene da timidina-cinase endógeno (*TK* para células humanas e *Tk* para células de roedores, coletivamente designadas *TK*). O presente método de ensaio destina-se a ser utilizado com duas linhas celulares: a linha celular L5178Y $TK^{+/-}$–3.7.2C do linfoma do rato (geralmente designada L5178Y) e a linha celular linfoblastoide humana TK6 (geralmente designada TK6). Embora as duas linhas variem devido à sua origem, crescimento celular, estatuto p53, etc., os ensaios da mutação do gene *Tk* podem ser realizados de forma semelhante em ambos os tipos de células, conforme descrito no presente método de ensaio.

3. A natureza autossómica e heterozigótica do gene da timidina-cinase permite detetar colónias viáveis cujas células são deficientes em enzima timidina-cinase após a mutação de $TK^{+/-}$ para $TK^{-/-}$. Essa deficiência pode resultar de eventos genéticos que afetam o gene *Tk*, incluindo mutações genéticas (mutações pontuais, mutações que deslocam o quadro de leitura, supressão de pequenas sequências, etc.) e eventos cromossómicos (supressão de grandes sequências e rearranjos cromossómicos, recombinação mitótica). Estes últimos são expressos em perdas de heterozigosidade, que é uma mudança genética comum de genes supressores tumorais na tumorigénese humana. Teoricamente, a perda de todo o cromossoma que comporta o gene *Tk* na sequência de perturbações do fuso mitótico e/ou não disjunção mitótica pode ser detetada no MLA. Com efeito, uma combinação de análises citogenéticas e moleculares mostra claramente que alguns TK mutantes do MLA resultam da ausência de disjunção. No entanto, a análise das provas mostra que os ensaios de mutação do gene *Tk* não permitem detetar de forma fiável a aneugénese aplicando critérios normais de citotoxicidade (descritos no presente método de ensaio), pelo que não é adequado utilizar estes ensaios para detetar a aneugénese (7)(8)(9).

▼**M8**

4. A mutação do gene *Tk* gera duas classes fenotípicas distintas de mutantes TK: os mutantes de crescimento normal, que crescem ao mesmo ritmo que as células heterozigóticas *TK,* e os mutantes de crescimento lento, que crescem com períodos de duplicação longos. Os mutantes de crescimento normal e de crescimento lento são reconhecidos como mutantes de colónia grande e mutantes de colónia pequena no MLA e como mutantes de colónia rápida e mutantes de colónia tardia no TK6. Foi explorada aprofundadamente a natureza molecular e citogenética dos mutantes do MLA de colónia grande e colónia pequena (8) (10) (11) (12) (13). A natureza molecular e citogenética dos mutantes TK6 de colónia rápida e de colónia tardia foram também objeto de estudo exaustivo (14) (15) (16) (17). Os mutantes de crescimento lento de ambos os tipos de células sofreram danos genéticos que envolvem genes putativos reguladores do crescimento perto do lócus do *TK* e que resultam em tempos de duplicação prolongados e na formação de colónias tardias ou pequenas (18). A indução de mutantes de crescimento lento foi associada à ação de produtos químicos que induzem grandes variações estruturais ao nível do cromossoma. As células cujo dano não implica o(s) gene(s) putativo(s) regulador(es) do crescimento perto do lócus do *TK* crescem a ritmos similares aos das células parentais e tornam-se mutantes de crescimento normal. A indução de mutantes de crescimento normal está associada a produtos químicos que funcionam principalmente como mutagénicos pontuais. Por conseguinte, é essencial contar tanto os mutantes de crescimento lento como os mutantes de crescimento normal para recuperar todos os mutantes e fornecer informações sobre o(s) tipo(s) de danos (mutagénicos/ /clastogénicos) induzidos pelo produto químico em estudo (10) (12) (18) (19).

5. O método de ensaio está estruturado de modo a fornecer informações gerais aplicáveis tanto ao MLA como ao TK6, e orientações específicas para os ensaios individuais.

6. As definições utilizadas constam do apêndice 1.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES

7. Os ensaios realizados *in vitro* exigem geralmente a utilização de uma fonte exógena de ativação metabólica. Os sistemas exógenos de ativação metabólica não reproduzem totalmente as condições *in vivo*.

8. Deve ter-se o cuidado de evitar condições suscetíveis de conduzir a resultados falsos positivos (ou seja, possível interação com o sistema de ensaio) não causados pela interação direta entre o produto químico em estudo e o material genético da célula; essas condições incluem variações do pH ou da pressão osmótica, a interação com os componentes do meio (20) (21) ou níveis excessivos de citotoxicidade (22)(23)(24). No MLA e no TK6, é considerada excessiva uma citotoxicidade que exceda os níveis de citotoxicidade máxima recomendados, estabelecidos no ponto 28. Além disso, é de notar que os produtos químicos em estudo análogos da timidina, ou com comportamento idêntico aos produtos análogos da timidina, podem aumentar a frequência de mutação por via do crescimento seletivo dos mutantes espontâneos durante o tratamento celular, exigindo métodos de ensaio complementares para uma avaliação adequada (25).

9. No caso dos nanomateriais fabricados, podem ser necessárias adaptações específicas ao presente método de ensaio, que não são descritas no mesmo.

10. Antes da aplicação do método de ensaio a uma mistura para obter dados com fins normativos, importa ponderar se – e, em caso afirmativo, por que motivo – o método pode proporcionar resultados adequados para o efeito. Essas considerações não são necessárias se existir um requisito regulamentar para o ensaio da mistura.

▼M8

11. As células mutantes deficientes em atividade enzimática da timidina-cinase devido a uma mutação $TK^{+/-}$ para $TK^{-/-}$ são resistentes aos efeitos citostáticos do análogo de pirimidina da trifluorotimidina (TFT). As células que dispõem de timidina-cinase são sensíveis ao TFT, que causa inibição do metabolismo celular e impede a divisão da célula. Logo, as células mutantes podem proliferar na presença de TFT, o que não acontece com as células que contêm a enzima timidina-cinase.

PRINCÍPIO DO ENSAIO

12. As células em suspensão são expostas ao produto químico em estudo, com e sem uma fonte exógena de ativação metabólica (ver ponto 19), por um período adequado (ver ponto 33), e, em seguida, subcultivadas para determinar a citotoxicidade e permitir a expressão fenotípica antes da seleção de mutantes. A citotoxicidade é determinada pelo crescimento relativo total (RTG, ver ponto 25), para o MLA, e pela sobrevivência relativa (RS, ver ponto 26), para o TK6. As culturas expostas são mantidas em meio de crescimento durante um período suficiente, específico de cada tipo de célula (ver ponto 37), por forma a permitir uma expressão fenotípica tão boa quanto possível das mutações induzidas. Após a expressão fenotípica, determina-se a frequência de mutação mediante a inoculação de um número conhecido de células num meio que contenha o agente seletivo, para a deteção de colónias mutantes, e num meio sem agente seletivo, para determinar as respetivas eficiências de clonagem (viabilidade). Após um período de incubação apropriado, procede-se à contagem das colónias. A frequência de mutação é calculada com base no número de colónias mutantes corrigido pela eficiência de clonagem no momento da seleção dos mutantes.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Preparações

Células

13. Para o MLA: Dado o MLA ter sido foi desenvolvido e caracterizado com a sublinha $TK^{+/-}$ –3.7.2C das células L5178Y, tem de se utilizar esta sublinha específica. A linha celular L5178Y foi derivada de um linfoma num timo de rato induzido por metilcolantreno DBA2 (26). Clive *et al*. trataram células L5178Y (designadas por Clive como $TK^{+/+}$ –3) com metanossulfonato de etilo e isolaram um clone $TK^{-/-}$ (designado $TK^{-/-}$ –3.7), usando bromodesoxiuridina como agente seletivo. A partir do clone $TK^{-/-}$, foram isolados e caracterizados para uso na AML um clone $TK^{+/-}$ espontâneo (designado $TK^{+/-}$ –3.7.2.) e um subclone (designado $TK^{+/-}$–3.7.2C) (27). O cariótipo da linha celular encontra-se publicado (28) (29) (30) (31). O número modal de cromossomas é 40. Existe um cromossoma metacêntrico (t12; 13) que deve ser contabilizado como cromossoma. O lócus da *TK* do rato está localizado na extremidade distal do cromossoma 11. A linha celular L5178Y $TK^{+/-}$ –3,7.2C tem mutações em ambos os alelos p53 e produz a proteína mutante p53 (32) (33). O estatuto p53 da linha celular $TK^{+/-}$–3,7.2C é provavelmente responsável pela capacidade do ensaio para detetar danos em grande escala (17).

14. Para o TK6: O TK6 é uma linha celular linfoblastoide humana. A linha celular-mãe é uma linha transformada pelo vírus de Epstein-Barr, WI-L2, originalmente derivada de um indivíduo do sexo masculino de 5 anos com esferocitose hereditária. O primeiro clone isolado, HH4, foi mutagenisado com ICR191, tendo sido gerada uma linha celular *TK* heterozigótica – TK6 (34). As células TK6 são quase diploides e o cariotipo representativo é 47, XY, 13+, t(14; 20), t(3; 21) (35). O lócus da *TK* humana está situado no braço longo do cromossoma 17. O TK6 é uma linha celular competente em p53, pois possui uma sequência de p53 de tipo selvagem em ambos os alelos e exprime apenas proteínas p53 do tipo selvagem (36).

▼M8

15. Tanto para o MLA como para o TK6, quando se estabelece ou reconstitui uma solução de reserva celular primária, é aconselhável que o laboratório de ensaio possa garantir a ausência de contaminação por *micoplasma*, identifique o cariótipo das células ou marque os cromossomas com o lócus da *TK*, e verifique o tempo de duplicação da população. Deve estabelecer-se o tempo normal do ciclo celular para as células utilizadas no laboratório de ensaio, tempo esse que deve ser coerente com as características celulares publicadas (16) (19) (37). Esta solução de reserva celular primária deve ser armazenada a uma temperatura não superior a -150 °C e usada para preparar todas as soluções de reserva de células de trabalho.

16. Quer antes do estabelecimento de um grande número de soluções de reserva de trabalho criopreservadas, quer imediatamente antes da sua utilização numa experiência, a cultura pode ter de ser limpa de células mutantes pré-existentes [a menos que a frequência de mutação (MF) do controlo do solvente já se encontre dentro da margem admissível – ver o quadro 2 para o MLA]. Para tal, utiliza-se metotrexato (aminopterina) para selecionar células deficientes em TK e adicionar à cultura timidina, hipoxantina e glicina (L5178Y) ou 2'--desoxicitidina (TK6), de forma a garantir o crescimento ótimo das células competentes em TK (19)(38)(39) e (40), para TK6. Em (19) (31) (37) (39) (41) podem encontrar-se orientações gerais sobre boas práticas de manutenção de culturas celulares, bem como aconselhamento específico para as células L5178Y e TK6. Relativamente aos laboratórios que necessitam de soluções de reserva celulares primárias para iniciar o MLA ou o TK6 ou para obter soluções de reserva de células principais, está disponível um repositório de células bem caracterizadas (37).

Meios e condições de cultura

17. Em ambos os ensaios, devem utilizar-se meios de cultura e condições de incubação adequados para a conservação das culturas (por exemplo, recipientes de cultura, atmosfera humidificada com 5 % de CO_2, temperatura de incubação de 37 °C). As culturas celulares devem ser sempre mantidas em condições que assegurem o seu crescimento exponencial. É particularmente importante escolher meios e condições de cultura que garantam um crescimento ótimo das células durante o período de expressão e clonagem das células mutantes e não mutantes. Para o MLA e o TK6, é também importante que as condições de cultura garantam um crescimento ótimo dos mutantes TK, tanto de grande colónia ou colónia rápida como de pequena colónia ou colónia tardia. Para mais informações sobre a cultura, incluindo a necessidade de aquecer adequadamente o soro de cavalo inativado, caso se utilize o meio RPMI durante a seleção de mutantes, consultar (19) (31) (38) (39) (40) (42).

Preparação das culturas

18. As células são propagadas a partir de soluções de reserva de culturas, inoculadas num meio de cultura a uma densidade que permita que as culturas em suspensão continuem a crescer exponencialmente durante o tratamento e os períodos de expressão.

Ativação metabólica

19. Quando se utilizam as células L5178Y e TK6, deve recorrer-se a sistemas metabolizantes exógenos, dado a sua capacidade metabólica endógena ser inadequada. O sistema que se utiliza com maior frequência, recomendado por defeito – salvo justificação em contrário – é uma fração pós-mitocondrial reforçada com co-fator (S9) preparada a partir de fígados de roedores (em geral, ratazanas) tratados com agentes de indução enzimática, como, por exemplo, Aroclor 1254 (43) (44) (45) ou uma mistura de fenobarbital e β-naftoflavona (46) (47) (48) (49) (50) (51). Esta última combinação não é contrária à Convenção de Estocolmo sobre Poluentes Orgânicos Persistentes (52) e comprovou-se ser tão eficaz na indução de oxidases de função mista como o Aroclor 1254 (45)(46)(47)(48)(49). A fração S9 é habitualmente utilizada em

▼M8

concentrações na gama de 1 % a 2 %, que podem ser aumentadas para a 10 % (v/v) no meio de ensaio final. A escolha do tipo e da concentração de sistema exógeno de ativação metabólica ou do indutor metabólico utilizado pode ser influenciada pela classe dos produtos químicos em estudo.

Preparação do produto químico em estudo

20. Os produtos químicos em estudo sólidos devem ser dissolvidos em solventes adequados e, se necessário, diluídos antes do tratamento das células (ver ponto 21). Os produtos químicos es estudo líquidos podem ser adicionados diretamente ao sistema de ensaio e/ou ser diluídos antes de serem utilizados no tratamento. Para o ensaio de produtos químicos gasosos ou voláteis, devem efetuar-se alterações adequadas aos protocolos normalizados, optando, por exemplo, pelo tratamento em recipientes de cultura fechados (53)(54)(55). A preparação do produto químico em estudo deve ser feita imediatamente antes do tratamento, a menos que os dados de estabilidade demonstrem que pode ser armazenado.

CONDIÇÕES DE REALIZAÇÃO DO ENSAIO

Solventes

21. O solvente deve ser escolhido de modo a otimizar a solubilidade dos produtos químicos em estudo sem afetar negativamente a realização do ensaio – por exemplo, alterando o crescimento celular, afetando a integridade do produto químico em estudo, reagindo com os recipientes de cultura ou alterando o sistema de ativação metabólica. Sempre que possível, recomenda-se a utilização de um solvente (ou meio de cultura) aquoso. A água e o dimetilsulfóxido, por exemplo, são solventes cujo desempenho é bem conhecido. No meio de tratamento final, os solventes orgânicos não devem exceder, em geral, 1 % (v/v) e os solventes aquosos (salinos ou água) não devem exceder 10 % (v/v). Se forem utilizados solventes cujo desempenho não é bem conhecido (p. ex., etanol ou acetona), devem fornecer-se dados que comprovem a respetiva compatibilidade com os produtos químicos e o sistema em estudo, bem como a inexistência de genotoxicidade à concentração utilizada. Na ausência de dados comprovativos, é importante incluir amostras de controlo não tratadas (ver apêndice 1, «Definições») para demonstrar que o solvente escolhido não tem efeitos deletérios ou mutagénicos.

MEDIÇÃO DA CITOTOXICIDADE E ESCOLHA DAS CONCENTRAÇÕES DE TRATAMENTO

22. Ao determinar a concentração máxima a ensaiar do produto químico em estudo, devem evitar-se concentrações passíveis de gerar respostas positivas falsas, como as que produzam citotoxicidade excessiva (ver ponto 28), precipitação no meio de cultura (ver ponto 20) ou alterações pronunciadas do pH ou da pressão osmótica (ver ponto 8). Se, ao ser adicionado, o produto químico em estudo causar uma alteração pronunciada do pH do meio, este pode ser ajustado por tamponamento do meio de tratamento final, de modo a evitar falsos resultados positivos e manter condições de cultura adequadas.

23. A seleção da concentração baseia-se na citotoxicidade e noutras considerações (ver pontos 27-30). Embora a avaliação da citotoxicidade num ensaio preliminar possa ser útil para definir melhor as concentrações a utilizar no ensaio principal, não é indispensável realizar esse ensaio. Mesmo no caso de se proceder a uma avaliação preliminar da citotoxicidade, continua a ser necessária a determinação da citotoxicidade em cada cultura no ensaio principal. Se for realizado um ensaio de determinação da gama de concentrações, este deve abranger uma vasta gama e pode terminar no dia 1 após o tratamento ou prolongar-se durante os dois dias de expressão, até à seleção de mutantes (caso se verifique que as concentrações utilizadas são adequadas).

▼**M8**

24. Deve determinar-se a citotoxicidade para cada cultura de ensaio e para cada cultura de controlo: os métodos para MLA (2) e TK6 (15) são definidos por práticas acordadas a nível internacional.

25. Tanto para o ágar como para as variantes micropoços do MLA: deve avaliar-se a citotoxicidade utilizando o crescimento relativo total (RTG) originalmente definido por Clive e Spector em 1975 (2). Esta medida inclui a suspensão relativa do crescimento durante o tratamento das células (RSG: cultura de ensaio *versus* controlo do solvente), o tempo de expressão e a eficiência relativa de clonagem no momento em que os mutantes são selecionados (RCE: cultura de ensaio *versus* controlo do solvente) (2). Note-se que a RSG inclui todas as perdas de células que ocorram na cultura de ensaio durante o tratamento (ver fórmulas no apêndice 2).

26. Para o TK6: A citotoxidade deve ser avaliada utilizando a taxa de sobrevivência relativa (RS), ou seja, a eficiência de clonagem das células colocadas em placas imediatamente após o tratamento, ajustada para ter em conta qualquer perda de células durante o tratamento, com base na contagem de células em comparação com o controlo negativo (taxa de sobrevivência de 100 %) (ver a fórmula no apêndice 2).

27. Devem avaliar-se pelo menos quatro concentrações de ensaio (não incluindo os controlos de solvente e positivos) que satisfaçam os critérios de aceitabilidade (citotoxicidade adequada, número de células, etc.). Embora seja aconselhável a utilização de culturas em duplicado, são igualmente aceitáveis culturas únicas em todas as concentrações a ensaiar. Os resultados obtidos com culturas replicadas independentes, a uma dada concentração, devem ser comunicados separadamente, mas podem ser agrupados para a análise de dados (55). No caso dos produtos químicos que demonstrem pouca ou nenhuma citotoxicidade, são normalmente adequadas concentrações espaçadas por um fator de 2 a 3. Quando se observa citotoxicidade, as concentrações escolhidas devem abranger uma gama com início na concentração que produz citotoxicidade, conforme descrito no ponto 28, e que inclua as concentrações às quais se observa pouca ou nenhuma citotoxicidade. Muitos produtos químicos em estudo apresentam curvas concentração-resposta com declive acentuado, pelo que, para abranger toda a gama de citotoxicidade ou para estudar em pormenor a relação dose-resposta, será necessário recorrer a concentrações menos espaçadas e a mais de quatro concentrações, em especial nos casos em que for necessário repetir o ensaio (ver ponto 70). A utilização de mais de quatro concentrações pode ser particularmente importante quando se utilizam culturas únicas.

28. Se a concentração máxima se basear na citotoxicidade, a concentração mais elevada deverá visar entre 20 % e 10 % de RTG para o MLA e entre 20 % e 10 % de RS para o TK6 (ponto 67).

29. No caso de produtos químicos pouco solúveis que não sejam citotóxicos a concentrações inferiores à concentração insolúvel mínima, a maior concentração analisada deve produzir, no final do tratamento com o produto químico em estudo, turbidez ou um precipitado visível a olho nu ou com o auxílio de um microscópio invertido. Mesmo no caso de se observar citotoxicidade acima da menor concentração insolúvel, é conveniente ensaiar uma única concentração que produza turbidez ou um precipitado visível, devido aos efeitos falsos que possam ser induzidos pelo precipitado. Dado que os ensaios MLA e TK6 utilizam culturas em suspensão, deve ter-se o cuidado de assegurar que os precipitados não interferem com a realização do ensaio. Neste contexto, pode igualmente ser útil determinar a solubilidade no meio de cultura antes do ensaio.

▼M8

30. Se não se observar precipitado nem citotoxicidade condicionante, a maior concentração ensaiada deve corresponder à menor das seguintes concentrações: 10 mM, 2 mg/ml ou 2 µl/ml (57)(58). Se o produto químico em estudo não tiver composição definida (caso, p. ex., de uma substância de composição desconhecida ou variável, de produtos de reação complexos ou de materiais biológicos [ou seja, substâncias químicas de composição desconhecida ou variável (UVCB)], de extratos ambientais, etc.), a concentração de topo poderá ter de ser mais elevada (p. ex., 5 mg/ml) na ausência de citotoxicidade, para aumentar a concentração de cada um dos componentes. Importa, contudo, notar que estes requisitos podem diferir no caso de medicamentos para uso humano (59).

Controlos

31. Para cada uma das condições experimentais, devem também realizar-se controlos negativos paralelos (ver ponto 21), em que as células são expostas apenas ao solvente e ao meio de tratamento, procedendo-se do mesmo modo que num ensaio normal.

32. São necessários controlos positivos para demonstrar a capacidade do laboratório para identificar mutagénios nas condições do protocolo de ensaio, a eficácia do sistema exógeno de ativação metabólica – se pertinente – e para detetar de forma adequada mutantes *TK* de colónias pequenas/tardias e de colónias grandes/rápidas. O quadro 1 apresenta exemplos de controlos positivos. Se tal se justificar, podem utilizar-se outras substâncias de controlo positivo. Dado que os ensaios de toxicidade genética *in vitro* em células de mamíferos estão suficientemente normalizados no que respeita a tratamentos paralelos de curta duração (3-4 horas) com e sem ativação metabólica por período idêntico, o recurso a produtos químicos de controlo positivo pode limitar-se a um mutagénico que necessite de ativação metabólica. Neste caso, a resposta de controlo positivo única demonstrará a atividade do sistema de ativação metabólica e a capacidade de resposta do sistema de ensaio. No entanto, devem efetuar-se controlos positivos para os tratamentos de longa duração (24 horas sem S9), dado que a duração do tratamento diferirá da do ensaio com ativação metabólica. Cada amostra de controlo positiva deverá ser utilizada numa ou mais das concentrações a que se prevê um aumento detetável e reprodutível relativamente à base, a fim de demonstrar a sensibilidade do sistema de ensaio; a resposta não deve ser comprometida pela citotoxicidade, de modo a exceder os limites especificados no método de ensaio (ver ponto 28).

Quadro 1

Substâncias de referência recomendadas para avaliação da competência técnica de um laboratório e para a seleção dos controlos positivos

Categoria	Substância	N.º CAS
1. Mutagénios ativos sem ativação metabólica		
	Metanossulfonato de metilo	66-27-3
	Mitomicina C	50-07-7
	N-óxido de 4-nitroquinolina	56-57-5
2. Mutagénios que necessitam de ativação metabólica		
	Benzo[a]pireno	50-32-8
	Ciclofosfamida mono-hidratada	50-18-0 (6055-19-2)
	7,12-Dimetilbenzoantraceno	57-97-6
	3-Metilcolantreno	56-49-5

▼M8

PROCEDIMENTO

Tratamento com o produto químico em estudo

33. As células em proliferação são expostas ao produto químico em estudo na presença e na ausência de um sistema de ativação metabólica. A exposição deve ter uma duração adequada (normalmente, de 3 a 4 horas). Importa, contudo, notar que estes requisitos podem diferir no caso de medicamentos para uso humano (59). No caso do MLA, se o tratamento de curta duração produzir resultados negativos e existirem dados que sugiram a necessidade de um tratamento mais longo [por exemplo, dispositivos análogos dos nucleósidos, produtos químicos pouco solúveis, (5) (59)], deve ponderar-se a possibilidade de prolongar o ensaio – por exemplo, 24 horas sem S9.

34. O número mínimo de células utilizado para cada cultura (controlada e tratada), em cada fase do ensaio, deve basear-se na frequência de mutação espontânea. Uma orientação genérica consiste em tratar e passar células suficientes em cada cultura experimental para manter, no mínimo, 100 mutantes espontâneos em todas as fases do ensaio (tratamento, expressão fenotípica e seleção de mutantes) (56).

35. Para o MLA, a frequência de mutação espontânea recomendada aceitável situa-se entre 35-140 $\times 10^{-6}$ (versão ágar) e 50-170 $\times 10^{-6}$ (versão micropoço) (ver quadro 2). Para ter pelo menos 10 e, idealmente, 100 mutantes espontâneos sobreviventes ao tratamento em cada cultura de ensaio, é necessário tratar pelo menos 6×10^6 células. O tratamento deste número de células e a manutenção de um número suficiente de células durante a fase de expressão e de clonagem para seleção de mutantes assegura um número suficiente de mutantes espontâneos (10 ou mais) em todas as fases da experiência, mesmo para as culturas tratadas em concentrações que resultam numa citotoxicidade de 90 % (medida por um RTG de 10 %) (19) (38) (39).

36. Para o TK6, a frequência de mutação espontânea é, em geral, entre 2 e 10×10^{-6}. Para ter, pelo menos, 10 mutantes espontâneos sobreviventes ao tratamento em cada cultura, é necessário tratar, pelo menos, 20×10^6 células. O tratamento deste número de células assegura um número suficiente de mutantes espontâneos (10 ou mais), mesmo nas culturas tratadas com concentrações que provoquem 90 % de citotoxicidade durante o tratamento (10 % RS). Além disso, deve cultivar-se um número suficiente de células durante o período de expressão, colocadas em placas para seleção de mutantes (60).

Período de expressão fenotípica e determinação da citotoxicidade e da frequência de mutação

37. No final do período de exposição, as células são cultivadas por um determinado período, para permitir a expressão fenotípica quase ótima das mutações recentemente induzidas, específicas de cada linha celular. Para o MLA, o período de expressão fenotípica é de 2 dias. Para o TK6, é de 3-4 dias. Se for utilizado um tratamento de 24 horas, o período de expressão tem início após o final do tratamento.

38. Durante o período de expressão fenotípica, as células são contadas diariamente. Para o MLA, as contagens de células diárias são utilizadas para calcular o crescimento diário da suspensão (SG). Após o período de expressão de 2 dias, as células são suspensas num meio com e sem agente seletivo, para a determinação do número de mutantes (placas de seleção) e da eficiência de clonagem (placas de viabilidade), respetivamente. No caso do MLA, existem dois métodos igualmente aceitáveis de clonagem para seleção de mutantes: um que utiliza ágar macio e outro que utiliza meio líquido em placas de 96 poços (19) (38) (39). A clonagem no TK6 é efetuada com um meio líquido e placas de 96 poços (16).

▼M8

39. A trifluorotimidina (TFT) é o único agente seletivo recomendado para mutantes *TK* (61).

40. Para o MLA, as placas de ágar e as placas de micropoços são contadas após 10 a 12 dias de incubação. No que diz respeito ao TK6, as colónias em placas de micropoços são contadas após 10 a 14 dias, para a deteção de mutantes precoces. A fim de recuperar os mutantes TK6 de crescimento lento (aparecimento tardio), é necessário voltar a expor as células a um meio de crescimento e a TFT após contagem dos mutantes precoces, e incubar as placas durante mais 7-10 dias (62). Ver pontos 42 e 44 para uma reflexão sobre a contagem dos mutantes *TK* de crescimento lento e normal.

41. O apêndice 2 especifica os cálculos adequados para os dois ensaios, incluindo os dois métodos (ágar e micropoço) para o MLA. No respeitante ao método ágar do MLA, as colónias são contadas e o número de colónias mutantes ajustado pela eficiência de clonagem para calcular uma MF. Quanto à versão de micropoços do MLA e do TK6, a eficiência de clonagem das placas de seleção e de clonagem é determinada de acordo com a distribuição de Poisson (63). Calcula-se a MF é calculada a partir destas duas eficiências de clonagem.

Caracterização de colónias mutantes

42. No MLA, se o produto químico em estudo for positivo (ver pontos 62 e 63), deve proceder-se à caracterização das colónias por dimensão ou por crescimento em, pelo menos, uma das culturas de ensaio (geralmente a concentração positiva mais elevada aceitável) e nos controlos negativos e positivos. Se o produto químico em estudo for negativo (ver ponto 64), a caracterização das colónias mutantes deve basear-se nos controlos negativos e positivos. No método dos micropoços do MLA, as colónias de mutantes pequenas são definidas como as que cobrem menos de 25 % do diâmetro do poço e as colónias de mutantes grandes como as que cobrem mais de 25 % do diâmetro do poço. No método do ágar, é utilizado um contador de colónias automático para contar as colónias mutantes e para medição do tamanho das colónias. As abordagens relativas à medição do tamanho das colónias constam das referências bibliográficas (19) (38) (40). É necessário caracterizar as colónias nos controlos negativos e positivos para demonstrar que os estudos são realizados de modo adequado.

43. O produto químico em estudo não pode ser considerado negativo se não se detetarem adequadamente colónias de mutantes grandes e colónias de mutantes pequenas no controlo positivo. A caracterização das colónias pode ser usada para obter informações gerais sobre a capacidade do produto químico em estudo de provocar mutações pontuais e/ou eventos cromossómicos (ponto 4).

44. TK6: Os mutantes de crescimento normal e de crescimento lento são diferenciados pela diferença do tempo de incubação (ver ponto 40). Para o TK6, em geral, os mutantes precoces e tardios são contados em todas as culturas, incluindo os controlos negativos e positivos. A caracterização das colónias dos controlos negativos e positivos é necessária para demonstrar que os estudos são realizados de modo adequado. O produto químico em estudo não pode ser considerado negativo se não for adequadamente detetada no controlo positivo a presença de mutantes precoces e tardios. A caracterização das colónias pode ser usada para fornecer informações gerais sobre a capacidade do produto químico em estudo de provocar mutações pontuais e/ou eventos cromossómicos (ponto 4).

▼M8

Competência técnica do laboratório

45. A fim de demonstrar que possui experiência suficiente com o ensaio antes de o realizar de forma rotineira, o laboratório deve ter realizado uma série de experiências com substâncias de referência positivas, que atuem através de diferentes mecanismos (pelo menos uma substância ativa com ativação metabólica e uma substância ativa sem ativação metabólica, selecionadas a partir das substâncias enumeradas no quadro 1), e vários controlos negativos (culturas não tratadas e vários solventes/veículos). As respostas observadas aos controlos positivos e negativos devem ser coerentes com as referências bibliográficas. Este requisito não é aplicável a laboratórios com experiência, isto é, que disponham de uma base de dados históricos, tal como se define nos pontos 47-50. No caso do MLA, os valores obtidos para os controlos positivos e negativos devem ser coerentes com as recomendações do IWGT (ver quadro 2).

46. Deve estudar-se uma seleção de substâncias de controlo positivo (ver quadro 1), com tratamentos curtos e longos (se forem utilizados tratamentos longos) na ausência de ativação metabólica, bem como com tratamentos curtos na presença de ativação metabólica, com vista a demonstrar competência técnica para detetar produtos químicos mutagénicos, determinar a eficácia do sistema de ativação metabólica e demonstrar a adequação das condições de crescimento das células durante o tratamento, a expressão fenotípica, a seleção de mutantes e os procedimentos de contagem. A gama de concentrações das substâncias selecionadas deve ser escolhida de forma a proporcionar aumentos reprodutíveis e dependentes da concentração relativamente ao nível de base, que permitam demonstrar a sensibilidade e a gama dinâmica do sistema de ensaio.

Dados históricos de controlo

47. O laboratório deve elaborar:

— um historial da gama e da distribuição dos controlos positivos;

— um historial da gama e da distribuição dos controlos negativos (amostras não tratadas, solvente).

48. Quando se obtêm os primeiros dados para uma distribuição histórica do controlo negativo, os controlos negativos paralelos devem ser coerentes com os dados de controlo negativo publicados. À medida que forem sendo adicionados mais dados experimentais à distribuição dos controlos, os controlos negativos em paralelo devem, de preferência, situar-se dentro dos limites de controlo de 95 % daquela distribuição (64) (65).

49. A base de dados históricos de controlo negativo deve ser inicialmente constituída por um mínimo de 10 experiências, embora de preferência, seja constituída por, pelo menos, 20 experiências efetuadas em condições comparáveis. Os laboratórios devem utilizar métodos de controlo de qualidade, como gráficos de controlo [p. ex., gráficos C ou gráficos de barras (65)], para identificar a variabilidade dos seus dados de controlo positivo e negativo e demonstrar que, no seu laboratório, a metodologia está sob controlo (66). A referência bibliográfica (64) contém mais informações e recomendações sobre a forma de obter e utilizar os dados históricos.

50. Os dados de controlo negativo devem consistir em frequências de mutação em culturas únicas ou, de preferência, replicadas, conforme descrito no ponto 27. Os controlos negativos em paralelo devem, de preferência, situar-se dentro dos limites de controlo de 95 % da distribuição da base de dados históricos do laboratório sobre o controlo negativo. Os dados do controlo negativo que se situem fora dos limites de controlo de 95 % podem ser aceitáveis para inclusão no historial de distribuição de controlo se não forem valores extremos, se houver indícios de que o sistema de ensaio está sob controlo (ver ponto 49) e se não houver indícios de erros humanos ou técnicos.

▼M8

51. As eventuais alterações ao protocolo experimental devem ser ponderadas em função da coerência dos dados com as bases de dados históricos de controlo do laboratório. As incoerências de monta devem conduzir à constituição de uma nova base de dados históricos de controlo.

DADOS E RELATÓRIOS

Apresentação dos resultados

52. A apresentação de dados para o MLA e para o TK6 deve incluir, no respeitante às culturas tratadas e de controlo, os dados necessários para o cálculo da citotoxidade (RTG ou RS, respetivamente) e das frequências de mutação, conforme a seguir se descreve.

53. No caso do MLA, devem ser fornecidos dados de cultura individuais para a RSG, o RTG, a eficiência de clonagem no momento da seleção de mutantes e o número de colónias mutantes (na versão ágar) ou o número de poços vazios (na versão micropoços). A MF deve ser expressa em número de células mutantes por milhão de células sobreviventes. Se a resposta for positiva, devem fornecer-se as MF das pequenas e grandes colónias (e/ou a percentagem da MF total) para, pelo menos, uma concentração do produto químico em estudo (geralmente a concentração positiva mais elevada) e para os controlos negativos e positivos. Em caso de resposta negativa, devem indicar-se as MF das colónias grande e pequena para o controlo negativo e o controlo positivo.

54. No que diz respeito ao TK6, devem fornecer-se dados de cultura individuais para a RS, a eficiência de clonagem no momento da seleção de mutantes e o número de poços vazios de mutantes precoces e tardios. A MF deve ser expressa em número de células mutantes por número de células sobreviventes, incluindo a MF total e a MF (e/ou a percentagem da MF total) dos mutantes precoces e tardios.

Critérios de aceitabilidade

55. Antes da determinação dos resultados globais relativos a um dado produto químico em estudo, devem estar cumpridos os seguintes critérios, tanto para o MLA como para o TK6:

— Foram ensaiadas duas condições experimentais (tratamento curto com e sem ativação metabólica – ver ponto 33), salvo se uma tiver dado resultados positivos.

— Deve ser possível analisar um número adequado de células e concentrações (ver pontos 27 e 34-36).

— Os critérios de seleção da concentração máxima são coerentes com os descritos nos pontos 28 a 30.

Critérios de aceitabilidade dos controlos negativos e positivos

56. A análise de um volume importante de dados pelo grupo de trabalho de peritos do IWGT sobre o MLA resultou num consenso internacional quanto aos critérios de aceitabilidade específicos do MLA (1) (2) (3) (4) (5). Por conseguinte, o presente método de ensaio formula recomendações específicas para determinar a aceitabilidade dos controlos negativos e positivos e para a avaliação dos resultados das várias substâncias no MLA. Para o TK6, a base de dados é muito mais reduzida e não foi avaliada por um grupo de trabalho.

▼M8

57. Em relação ao MLA, cada experiência deve ser avaliada de modo a verificar se as amostras de controlo não tratadas e com solvente cumprem os critérios de aceitação do grupo de trabalho do IWGT sobre o MLA [(4) e quadro 2 *infra*] no respeitante ao seguinte: (1) as MF (note-se que as MF aceitáveis para o IWGT diferem para as versões ágar e de micropoços do MLA), (2) a eficiência de clonagem (CE) no momento do processo da seleção de mutantes e (3) o crescimento das suspensões (SG) para o controlo do solvente (ver fórmulas no apêndice 2).

Quadro 2

Critérios de aceitabilidade para o MLA

Parâmetro	Método do ágar macio	Método de micropoços
Frequência de mutação	$35 – 140 \times 10^{-6}$	$50 – 170 \times 10^{-6}$
Eficiência de clonagem	65 – 120 %	65 – 120 %
Crescimento da suspensão	8-32 vezes (tratamento de 3 a 4 horas) 32-180 vezes (tratamento de 24 horas, se realizado)	8-32 vezes (tratamento de 3 a 4 horas) 32-180 vezes (tratamento de 24 horas, se realizado)

58. No respeitante ao MLA, cada ensaio deve também ser avaliado quanto à questão de saber se o(s) controlo(s) positivo(s) satisfaz(em), pelo menos, um dos dois critérios de aceitação seguintes, definidos pelo grupo de trabalho do IWGT:

— O controlo positivo mostra um aumento absoluto da MF total, ou seja, um aumento em relação à MF espontânea [uma MF induzida (IMF)] de, pelo menos, 300×10^{-6}. Pelo menos 40 % da IMF deve refletir-se na MF da colónia.

— O controlo positivo mostra um aumento da MF da colónia pequena de, pelo menos, 150×10^{-6}, em relação à observada na amostra de controlo não tratada ou do solvente paralela (uma pequena colónia IMF de 150×10^{-6}).

59. No caso do TK6, um ensaio é aceitável se o controlo negativo paralelo for considerado aceitável para adição à base de dados históricos de controlo negativo do laboratório, conforme descrito nos pontos 48 e 49. Além disso, os controlos positivos paralelos (ver ponto 32) devem induzir respostas compatíveis com as geradas na base de dados históricos de controlo positivo e produzir um aumento estatisticamente significativo em relação ao controlo negativo paralelo.

60. Para ambos os ensaios, o limite superior de citotoxicidade observada na cultura de controlo positivo deve ser idêntico ao das culturas experimentais, ou seja, o RTG/RS não deve ser inferior a 10 %. Basta utilizar uma única concentração (ou uma das concentrações das culturas de controlo positivo, se se utilizar mais do que uma concentração) para demonstrar que os critérios de aceitação para o controlo positivo foram satisfeitos. Além disso, a MF do controlo positivo deve situar-se dentro da gama aceitável estabelecida para o laboratório.

Avaliação e interpretação dos resultados

61. No que se refere ao MLA, o Mouse Lymphoma Expert Workgroup do IWGT realizou um trabalho significativo sobre a importância biológica e os critérios de uma resposta positiva (4). Por conseguinte, o presente método de ensaio apresenta recomendações específicas para a interpretação dos resultados do produto químico em estudo do MLA (ver pontos 62-64). A base de dados do

▼M8

TK6 é muito mais reduzida e não foi avaliada por um grupo de trabalho. Por conseguinte, as recomendações para a interpretação dos dados para o TK6 são apresentadas em termos mais genéricos (ver pontos 65-66). Existem recomendações adicionais para ambos os ensaios (ver pontos 67-71).

MLA

62. Recomenda-se a adoção de uma abordagem para definir as respostas positivas e negativas, a fim de assegurar que o número acrescido de MF é biologicamente relevante. Em vez da análise estatística geralmente usada para outros ensaios, o presente baseia-se no recurso a uma frequência de mutação induzida predefinida (ou seja, um aumento da MF acima do controlo paralelo), designada «Fator de Avaliação Global» (GEF), baseada na análise da distribuição do controlo negativo dos dados sobre a MF dos laboratórios participantes (4). Para a versão do ágar do MLA, o GEF é de 90×10^{-6} e para a versão dos micropoços do MLA o GEF é de 126×10^{-6}.

63. Se se verificar que são cumpridos todos os critérios de aceitabilidade, considera-se o produto químico em estudo inequivocamente positivo se, numa das condições de ensaio examinadas (ver ponto 33), o aumento da MF acima dos valores paralelos exceder o GEF e estiver relacionado com a concentração (por exemplo, utilizando uma análise de tendências). O produto químico em estudo é então considerado apto a induzir mutações, no contexto do sistema de ensaio.

64. Se forem cumpridos todos os critérios de aceitabilidade, considera-se o produto químico em estudo inequivocamente negativo se, em todas as condições de ensaio examinadas (ver ponto 33), não se verificar uma resposta relacionada com a concentração ou, caso se verifique um aumento da MF, este não exceder o GEF. Assim, o produto químico não é considerado passível de induzir mutações, no contexto do sistema de ensaio.

TK6

65. Se forem cumpridos todos os critérios de aceitabilidade, considera-se o produto químico em estudo inequivocamente positivo se, em qualquer das condições experimentais examinadas (ver ponto 33):

— pelo menos uma das concentrações de ensaio apresentar um aumento estatisticamente significativo em relação ao controlo negativo,

— o aumento, avaliado com base numa análise de tendências adequada, depender da concentração (ver ponto 33),

— nenhum dos resultados estiver fora da distribuição dos dados históricos de controlo negativo (p. ex., limites de controlo de 95 % com base numa distribuição de Poisson; ver ponto 48).

Se todos estes critérios forem preenchidos, considera-se o produto químico em estudo passível de induzir mutações no âmbito do presente sistema de ensaio. As referências bibliográficas (66) (67) contêm recomendações sobre os métodos estatísticos mais adequados.

66. Se forem cumpridos todos os critérios de aceitabilidade, o produto químico em estudo é considerado inequivocamente negativo se, em todas as condições experimentais examinadas (ver ponto 33):

— nenhuma das concentrações de ensaio apresentar um aumento estatisticamente significativo em relação ao controlo negativo,

— não se observar qualquer aumento dependente da dose, numa avaliação feita com base numa análise de tendências adequada.

▼M8

— todos os resultados se situarem dentro da distribuição dos dados históricos de controlo negativo (p. ex., limites de controlo de 95 % com base numa distribuição de Poisson; ver ponto 48).

Nesse caso, considera-se que o produto químico não é passível de induzir mutações, no contexto do sistema de ensaio.

Para o MLA e o TK6:

67. Se a concentração máxima se basear na citotoxicidade, a concentração mais elevada deverá estar entre 20 % e 10 % do RTG/RS. É consensual que se deve ter cuidado ao interpretar os resultados positivos apenas entre 20 % e 10 % do RTG/RS e que um resultado não deve ser considerado positivo se o aumento da MF ocorrer apenas a 10 % do RTG/RS ou abaixo deste valor (se avaliado) (2) (59).

68. Em alguns casos, certas informações adicionais podem ajudar a determinar que um produto químico em estudo não é mutagénico, se não existir nenhuma cultura com um valor de RTG compreendido entre 10 e 20 % do RTG/RS. Estas situações definem-se do seguinte modo: (1) não há provas de mutagenicidade (por exemplo, inexistência de resposta às doses, de frequências de mutação acima das observadas nas gamas de controlo negativo paralelas ou históricas, etc.) numa série de pontos de dados compreendida entre 100 % e 20 % do RTG/RS, observando-se, pelo menos, um ponto de dados entre 20 % e 25 % do RTG/RS; (2) não há provas de mutagenicidade (por exemplo, iexistência de resposta às doses, de frequências de mutação acima das observadas nas gamas de controlo negativo paralelas ou históricas, etc.) numa série de pontos de dados entre 100 % e 25 % do RTG/RS, observando-se um ponto negativo ligeiramente inferior a 10 % do RTG/RS. Em ambas as situações, o produto químico em estudo pode ser considerado negativo.

69. Não há nenhuma exigência concreta para a verificação de uma resposta inequivocamente positiva ou negativa.

70. No caso de a resposta não ser inequivocamente positiva nem inequivocamente negativa, como se descreveu, e/ou para se tirarem conclusões quanto à importância biológica do resultado, os dados devem ser avaliados por peritos e/ou ser objeto de estudos complementares. Pode ser útil proceder a um ensaio de repetição, eventualmente alterando as condições experimentais (intervalo diferente entre as concentrações – para aumentar a probabilidade de atingir pontos de dados entre 10 e 20 % do RTG/RS –, condições de ativação metabólica diferentes – p. ex., concentração ou origem do S9 – e duração diferente do tratamento).

71. Em casos raros, mesmo após a realização de estudos complementares, os dados obtidos não permitem concluir por um resultado positivo ou negativo. Nessas circunstâncias, deve concluir-se que a resposta do produto químico em estudo é ambígua (interpretada como igualmente suscetível de ser positiva ou negativa).

RELATÓRIO DE ENSAIO

72. O relatório do ensaio deve incluir as seguintes informações:

Produto químico em estudo:

— origem, número de lote e data-limite de utilização, se conhecidos;

— estabilidade do produto químico em estudo, se conhecida;

— solubilidade e estabilidade do produto químico em estudo no solvente, se conhecidas;

▼**M8**

— medição do pH, da pressão osmótica e da quantidade de precipitado no meio de cultura ao qual foi adicionado o produto químico em estudo, consoante o que for adequado.

Substância monocomponente:

— aspeto físico, hidrossolubilidade e outras propriedades físico-químicas pertinentes;

— dados de identificação química, como as denominações IUPAC ou CAS, número CAS, código SMILES ou InChI, fórmula estrutural, pureza, identidade química das impurezas, se justificado e exequível, etc.

Substâncias multicomponentes, UVCB e misturas:

— caracterizada, na medida do possível, pela identidade química (ver acima), ocorrência quantitativa e principais propriedades físico-químicas dos componentes.

Solvente:

— justificação da escolha do solvente;

— percentagem de solvente no meio de cultura final.

Células:

Para as culturas principais de laboratório:

— tipo e origem das células e antecedentes no laboratório de ensaio;

— características do cariótipo e/ou número modal de cromossomas.

— métodos de manutenção das culturas celulares;

— ausência de micoplasma;

— tempo de duplicação celular.

Condições de realização do ensaio:

— justificação da escolha das concentrações e do número de culturas de células, incluindo, por exemplo, dados sobre a citotoxicidade e sobre as limitações de solubilidade;

— composição dos meios, concentração de CO_2, nível de humidade;

— concentração do produto químico em estudo, expressa em concentração final no meio de cultura (p. ex., µg ou mg/ml ou mM do meio de cultura);

— concentração (e/ou volume) de solvente e de produto químico em estudo adicionada ao meio de cultura;

— temperatura de incubação;

— tempo de incubação;

— duração do tratamento;

— densidade celular durante a exposição;

▼**M8**

— tipo e composição do sistema de ativação metabólica (fonte de S9, método de preparação da mistura de S9, concentração ou volume da mistura de S9 e de S9 no meio de cultura final, controlos de qualidade do S9);

— substâncias de controlo positivo e negativo, concentrações finais para cada condição de tratamento;

— duração do período de expressão (incluindo o número de células inoculadas e os calendários de subcultura e de alimentação, quando aplicável),

— identidade do agente seletivo e respetiva concentração;

— para o MLA, indicar a versão utilizada (ágar ou micropoço).

— critérios de aceitabilidade dos ensaios;

— métodos utilizados para a contagem das células mutantes e viáveis,

— métodos de medição da citotoxicidade;

— outros dados pertinentes relativos à citotoxicidade e ao método utilizado;

— duração dos períodos de incubação após a colocação em placas;

— definição das colónias cuja dimensão e tipo são caracterizados (incluindo os critérios para a definição de colónias «pequenas» e «grandes», conforme apropriado).

— critérios para que o estudo seja considerado positivo, negativo ou inconclusivo;

— métodos utilizados para determinar o pH, a pressão osmótica e a precipitação, se pertinente.

Resultados:

— número de células expostas e número de células subcultivadas para cada cultura;

— parâmetros de toxicidade (RTG para o MLA e RS para o TK6);

— sinais de precipitação e instante da determinação;

— número de células colocadas em placas em meio seletivo e não seletivo;

— número de colónias em meio não seletivo, número de colónias resistentes em meio seletivo e frequências de mutação conexas;

— definição do tamanho das colónias para os controlos negativos e positivos e, se o produto químico em estudo for positivo, pelo menos uma concentração e as frequências de mutação afins;

— relação concentração-resposta, quando for possível determiná-la;

— dados relativos aos controlos negativos (solvente) e controlos positivos (concentrações e solventes) realizados em paralelo;

— dados históricos sobre o controlo negativo (solvente) e positivo (concentrações e solventes), com as correspondentes gamas, médias e desvios-padrão; número de ensaios em que se baseiam os controlos históricos;

▼M8

— análises estatísticas (para culturas individuais e replicados agrupados, se for caso disso) e valores p, caso existam; para o MLA, a avaliação GEF.

Discussão dos resultados

Conclusão

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(1) Moore, M.M., Honma, M. Clements, J. (Rapporteur), Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cole, J., Gollapudi, B., Harrington-Brock, K., Mitchell, A., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M-C., San, R., Shimada, H. and Stankowski, L.F. Jr. (2000). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus (TK) Gene Mutation Assay: International Workshop on Genotoxicity Test Procedures (IWGTP) Workgroup Report, Environ. Mol. Mutagen., 35 (3): 185-190.

(2) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Harrington-Brock, K., Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Collard, D., Fellows, M., Flanders, K., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Kraycer, J., McEnaney, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Oliver, Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Shimada, H. and Stankowski, L.F. Jr. (2002). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: Follow-Up International Workshop on Genotoxicity Test Procedures, New Orleans, Louisiana, (April 2000), Environ. Mol. Mutagen., 40 (4): 292-299.

(3) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Delongchamp, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Stankowski, L.F. Jr., Thakur, A., Wakuri, S. and Yoshimura, I. (2003). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: International Workshop (Plymouth, UK) on Genotoxicity Test Procedures Workgroup Report, Mutation Res., 540: 127-140.

(4) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Delongchamp, R., Durward, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Lloyd, M., Majeska, J., Myhr, B., O'Donovan, M., Omori, T., Riach, C., San, R., Stankowski, L.F. Jr., Thakur, A.K., Van Goethem, F., Wakuri, S. and Yoshimura, I. (2006). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Gene Mutation Assay: Follow-Up Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Tests – Aberdeen, Scotland, 2003 – Assay Acceptance Criteria, Positive Controls, and Data Evaluation, Environ. Mol. Mutagen., 47 (1): 1-5.

(5) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Clay, P., Doppalapudi, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Muster, W., Pant, K., Kidd, D.A., Lorge, E., Lloyd, M., Myhr, B., O'Donovan, M., Riach, C., Stankowski, L.F. Jr., Thakur A.K. and Van Goethem, F. (2007). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Mutation Assay: Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Testing, San Francisco, 2005, Recommendations for 24-h Treatment, Mutation. Res., 627 (1): 36-40.

(6) OCDE (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No 234, OECD, Paris.

(7) Fellows M.D., Luker, T., Cooper, A. and O'Donovan, M.R. (2012). Unusual Structure-Genotoxicity Relationship in Mouse Lymphoma Cells Observed with a Series of Kinase Inhibitors. Mutation, Res., 746 (1): 21-28.

(8) Honma, M., Momose, M., Sakamoto, H., Sofuni, T. and Hayashi, M. (2001). Spindol Poisons Induce Allelic Loss in Mouse Lymphoma Cells Through Mitotic Non-Disjunction. Mutation Res., 493 (1-2): 101-114.

▼**M8**

(9) Wang, J., Sawyer, J.R., Chen, L., Chen, T., Honma, M., Mei, N. and Moore, M.M. (2009). The Mouse Lymphoma Assay Detects Recombination, Deletion, and Aneuploidy, *Toxicol*. Sci., 109 (1): 96-105.

(10) Applegate, M.L., Moore, M.M., Broder, C.B., Burrell, A., and Hozier, J.C. (1990). Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells. Proc. National. Academy. J. Environ. Sci. USA, 87 (1): 51-55.

(11) Hozier, J., Sawyer, J., Moore, M., Howard, B. and Clive, D. (1981). Cytogenetic Analysis of the L5178Y/$TK^{+/-}$ Leads to $TK^{-/-}$ Mouse Lymphoma Mutagenesis Assay System, Mutation Res., 84 (1): 169--181.

(12) Hozier, J., Sawyer, J., Clive, D. and Moore, M.M. (1985). Chromosome 11 Aberrations in Small Colony L5178Y $TK^{-/-}$ Mutants Early in their Clonal History, Mutation Res., 147 (5): 237-242.

(13) Moore, M.M., Clive, D., Hozier, J.C., Howard, B.E., Batson, A.G., Turner, N.T. and Sawyer, J. (1985). Analysis of Trifluorothymidine--Resistant (TFTr) Mutants of L5178Y/$TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells. Mutation Res., 151 (1): 161-174.

(14) Liber H.L., Call K.M. and Little J.B. (1987). Molecular and Biochemical Analyses of Spontaneous and X-Ray-Induced Mutants in Human Lymphoblastoid Cells. Mutation Res., 178 (1): 143-153.

(15) Li C.Y., Yandell D.W. and Little J.B. (1992). Molecular Mechanisms of Spontaneous and Induced Loss of Heterozygosity in Human Cells *In Vitro*. Somat. Cell Mol. Genet., 18 (1): 77-87.

(16) Honma M., Hayashi M. and Sofuni T. (1997). Cytotoxic and Mutagenic Responses to X-Rays and Chemical Mutagens in Normal and P53--Mutated Human Lymphoblastoid Cells. Mutation. Res., 374 (1): 89-98.

(17) Honma, M., Momose, M., Tanabe, H., Sakamoto, H., Yu, Y., Little, J.B., Sofuni, T. and Hayashi, M. (2000). Requirement of Wild-Type P53 Protein for Maintenance of Chromosomal Integrity. Mol. Carcinogen., 28 (4): 203-14.

(18) Amundson S.A. and Liber H.L. (1992). A Comparison of Induced Mutation at Homologous Alleles of the TK Locus in Human Cells. II. Molecular Analysis of Mutants. Mutation Res., 267 (1): 89-95.

(19) Schisler M.R., Moore M.M. and Gollapudi B.B. (2013). *In Vitro* Mouse Lymphoma (L5178Y $TK^{+/-}$ –3.7.2C) Forward Mutation Assay. In Protocols in Genotoxicity Assessment A. Dhawan and M. Bajpayee (Eds.), Springer Protocols, Humana Press: 27-50.

(20) Long, L.H., Kirkland, D., Whitwell, J. and Halliwell, B. (2007). Different Cytotoxic and Clastogenic Effects of Epigallocatechin Gallate in Various Cell-Culture Media Due to Variable Rates of its Oxidation in the Culture Medium, Mutation Res., 634 (1-2): 177-183.

(21) Nesslany, F., Simar-Meintieres, S., Watzinger, M., Talahari, I. and Marzin, D. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. Environ. Mol. Mutagen., 49 (6): 439-452.

(22) Brusick D. (1986). Genotoxic Effects in Cultured Mammalian Cells Produced by Low pH Treatment Conditions and Increased Ion Concentrations. Environ. Mutagen., 8 (6): 879-886.

(23) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. and Okumura, K. (1992). Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells. Mutation Res., 268 (2): 297-305.

▼**M8**

(24) Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M.Jr, Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B.C. (1991). Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. Mutation Res., 257: 147-204.

(25) Wang J., Heflich R.H. and Moore M.M. (2007). A Method to Distinguish Between the *De Novo* Induction of Thymidine Kinase Mutants and the Selection of Pre-Existing Thymidine Kinase Mutants in the Mouse Lymphoma Assay. Mutation Res., 626 (1-2): 185-190.

(26) Fischer, G.A. (1958). Studies on the Culture of Leukemic Cells *In Vitro*. Ann. N.Y. Academy Sci., 76: 673-680.

(27) Clive, D., Johnson, K.O., Spector, J.F.S., Batson, A.G. and Brown, M.M.M. (1979). Validation and Characterization of the L5178Y/TK+/– Mouse Lymphoma Mutagen Assay System. Mutation Res., 59(1): 61--108.

(28) Sawyer, J., Moore, M.M., Clive, D. and Hozier, J. (1985). Cytogenetic Characterization of the L5178Y $TK^{+/-}$ 3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, Mutation Res., 147 (5): 243-253.

(29) Sawyer J.R., Moore M.M. and Hozier J.C. (1989). High-Resolution Cytogenetic Characterization of the L5178Y $TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cell Line, Mutation Res., 214 (2): 181-193.

(30) Sawyer, J.R., Binz, R.L., Wang, J. and Moore, M.M. (2006). Multicolor Spectral Karyotyping of the L5178Y $TK^{+/-}$–3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, Environ. Mol. Mutagen., 47 (2): 127-131.

(31) Fellows, M.D., McDermott, A., Clare, K.R., Doherty, A. and Aardema, M.J. (2014). The Spectral Karyotype of L5178Y $TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells Clone 3.7.2C and Factors Affecting Mutant Frequency at the Thymidine Kinase (TK) Locus in the Microtitre Mouse Lymphoma Assay, Environ. Mol. Mutagen., 55 (1): 35-42.

(32) Storer, R.D., Jraynak, A.R., McKelvey, T.W., Elia, M.C., Goodrow, T.L. and DeLuca, J.G. (1997). The Mouse Lymphoma L5178Y $TK^{+/-}$ Cell Line is Heterozygous for a Codon 170 Mutation in the P53 Tumor Suppressor Gene. Mutation. Res., 373 (2): 157-165.

(33) Clark L.S., Harrington-Brock, K., Wang, J., Sargent, L., Lowry, D., Reynolds, S.H. and Moore, M.M. (2004). Loss of P53 Heterozygosity is not Responsible for the Small Colony Thymidine Kinase Mutant Phenotype in L5178Y Mouse Lymphoma Cells. Mutagen., 19 (4): 263-268.

(34) Skopek T.R., Liber, H.L., Penman, B.W. and Thilly, W.G. (1978). Isolation of a Human Lymphoblastoid Line Heterozygous at the Thymidine Kinase Locus: Possibility for a Rapid Human Cell Mutation Assay. Biochem. Biophys. Res. Commun., 84 (2): 411-416.

(35) Honma M. (2005). Generation of Loss of Heterozygosity and its Dependency on P53 Status in Human Lymphoblastoid Cells. Environ. Mol. Mutagen., 45 (2-3): 162-176.

(36) Xia, F., Wang, X., Wang, Y.H., Tsang, N.M., Yandell, D.W., Kelsey, K.T. and Liber, H.L. (1995). Altered P53 Status Correlates with Differences in Sensitivity to Radiation-Induced Mutation and Apoptosis in Two Closely Related Human Lymphoblast Lines. Cancer. Res., 55 (1): 12-15.

▼**M8**

(37) Lorge, E., M. Moore, J. Clements, M. O Donovan, M. Honma, A. Kohara, J. van Benthem, S. Galloway, M.J. Armstrong, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Kim, A. Sutter, D.J. Kirkland (2015). Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. (Manuscrito em preparação).

(38) Lloyd M. and Kidd D. (2012). The Mouse Lymphoma Assay. Springer Protocols: Methods in Molecular Biology 817, Genetic Toxicology Principles and Methods, ed. Parry and Parry, Humana Press. ISBN, 978-1-61779-420-9, 35-54.

(39) Mei N., Guo X. and Moore M.M. (2014). Methods for Using the Mouse Lymphoma Assay to Screen for Chemical Mutagenicity and Photo-Mutagenicity. In: Optimization in Drug Discover: *In Vitro* Methods: Yan Z and Caldwell(Eds), 2nd Edition, GW; Humana Press, Totowa, NJ.

(40) Liber H.L. and Thilly W.G. (1982). Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploidhuman Lymphoblasts. Mutation Res., 94 (2): 467-485.

(41) Coecke, S., Balls, M., Bowe, G., Davis, J., Gstraunthaler, G., Hartung, T., Hay, R., Merten, OW., Price, A., Schechtman, L., Stacey, G. and Stokes, W. (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice. ATLA, 33 (3): 261-287.

(42) Moore M.M. and Howard B.E. (1982). Quantitation of Small Colony Trifluorothymidine-Resistant Mutants of L5178Y/TK+/- Mouse Lymphoma Cells in RPMI-1640 Medium, Mutation Res., 104 (4-5): 287-294.

(43) Ames B.N., McCann J. and Yamasaki E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test. Mutation Res., 31 (6): 347-364.

(44) Maron D.M. and Ames B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res., 113 (3-4): 173-215.

(45) Natarajan, A.T., Tates, A.D, Van Buul, P.P.W., Meijers, M. and De Vogel, N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens After Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. Mutation Res., 37 (1): 83-90.

(46) Matsuoka A., Hayashi M. and Ishidate M. Jr. (1979). Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *In Vitro*. Mutation Res., 66 (3): 277-290.

(47) Ong T.M., *et al.* (1980). Differential Effects of Cytochrome P450-Inducers on Promutagen Activation Capabilities and Enzymatic Activities of S-9 from Rat Liver, J. Environ. *Pathol*. *Toxicol*., 4 (1): 55-65

(48) Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992). Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254--Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. Mutagen., 7 (3): 175-177.

(49) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. In: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing. de Serres F.J., *et al.* (Eds, Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

▼**M8**

(50) Galloway S.M., *et al.* (1994). Report from Working Group on *In Vitro* Tests for Chromosomal Aberrations. Mutation Res., 312 (3): 241-261.

(51) Johnson T.E., Umbenhauer D.R. and Galloway S.M. (1996). Human Liver S-9 Metabolic Activation: Proficiency in Cytogenetic Assays and Comparison with Phenobarbital/Beta-Naphthoflavone or Aroclor 1254 Induced Rat S-9, Environ. Mol. Mutagen., 28 (1): 51-59.

(52) UNEP (2001). Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP).

(53) Krahn D.F., Barsky F.C. and McCooey K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. In: Genotoxic Effects of Airborne Agents Tice R.R., Costa D.L.and Schaich K.M. (Eds.). New York, Plenum, pp. 91-103.

(54) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. and Brooks, A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. Environ. Mutagen., 5 (6): 795-801.

(55) Asakura M., Sasaki T., Sugiyama T., Arito H., Fukushima, S. and Matsushima, T. (2008). An Improved System for Exposure of Cultured Mammalian Cells to Gaseous Compounds in the Chromosomal Aberration Assay. Mutation Res., 652 (2): 122-130.

(56) Arlett C.F., *et al.* (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J. (Ed.), CambridgeUniversity Press, pp. 66--101.

(57) Morita T., Honma M. and Morikawa K. (2012). Effect of Reducing the Top Concentration Used in the *In Vitro* Chromosomal Aberration Test in CHL Cells on the Evaluation of Industrial Chemical Genotoxicity. Mutation Res., 741 (1-2): 32-56.

(58) Brookmire L., Chen J.J. and Levy D.D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In Vitro* Chromosome Aberrations Assay. Environ. Mol. Mutagen., 54 (1): 36-43.

(59) USFDA (2012). International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use. Disponível em: [https:// /www.federalregister.gov/a/2012-13774].

(60) Honma M. and Hayashi M. (2011). Comparison of *In Vitro* Micronucleus and Gene Mutation Assay Results for P53-Competent Versus P53-Deficient Human Lymphoblastoid Cells. Environ. Mol. Mutagen., 52 (5): 373-384.

(61) Moore-Brown, M.M., Clive, D., Howard, B.E., Batson, A.G. and Johnson, K.O. (1981). The Utilization of Trifluorothymidine (TFT) to Select for Thymidine Kinase-Deficient ($TK^{-/-}$) Mutants from L5178Y/$TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells, Mutation Res., 85 (5): 363-378.

(62) Liber H.L., Yandell D.W. and Little J.B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HRPT Loci in Human Lymphoblastoid Cells; Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK locus. Mutation Res., 216 (1): 9-17.

(63) Furth E.E., Thilly, W.G., Penman, B.W., Liber, H.L. and Rand, W.M. (1981). Quantitative Assay for Mutation in Diploid Human Lymphoblasts Using Microtiter Plates. Anal. Biochem., 110 (1): 1-8.

(64) Hayashi, M, Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H. J. and Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data, Mutation Res., 723 (2): 87-90.

▼**M8**

(65) Ryan T.P. (2000). Statistical Methods for Quality Improvement. John Wiley and Sons, New York 2nd Edition.

(66) OCDE (2014). Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 199.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(67) Fleiss J.L., Levin B. and Paik M.C. (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions, Third Edition, New York: John Wiley & Sons.

▼M8

Apêndice 1

DEFINIÇÕES

Amostra de controlo não tratada: Cultura não sujeita a qualquer tratamento (com o produto químico em estudo ou solvente), mas processada do mesmo modo que as culturas tratadas com o produto químico em estudo.

Aneugénio: Produto ou processo químico que, por interação com os componentes do aparelho do ciclo mitótico e meiótico de divisão celular, origina aneuploidia em células ou organismos.

Aneuploidia: Desvio, num único ou em mais cromossomas, mas não por séries completas de cromossomas (poliploidia), do número diploide (ou haploide) normal de cromossomas.

Citotoxicidade: No âmbito dos ensaios abrangidos pelo presente método de ensaio, a citotoxicidade é identificada como uma redução do crescimento relativo total (RTG) ou da sobrevivência relativa (RS) para, respetivamente, o MLA e o TK6.

Clastogénio: Produto ou processo químico que provoca aberrações cromossómicas estruturais em populações de células ou organismos.

Crescimento da suspensão (SG): Aumento do número de células durante as fases de tratamento e expressão do MLA. O SG é calculado multiplicando o aumento registado no dia 1, pelo aumento do dia 2 para o tratamento curto (3-4 horas). Se for utilizado um tratamento de 24 horas, o SG é o aumento durante o tratamento de 24 horas multiplicado pelos aumentos dos dias 1 e 2.

Crescimento relativo em suspensão (RSG): No caso do MLA, crescimento total relativo da cultura após dois dias em suspensão em comparação com o crescimento total do controlo negativo/de solvente em dois dias (Clive e Spector, 1975). O RSG deve incluir o crescimento relativo da cultura de ensaio em relação ao controlo negativo/de solvente durante o período de exposição.

Crescimento total relativo (RTG): Utilizado como medida da citotoxicidade do MLA decorrente do tratamento. É uma medida do crescimento relativo (em relação ao controlo do veículo) das culturas de ensaio durante as fases de tratamento, dois dias de expressão, seleção e clonagem de mutantes do ensaio. O RSG de cada cultura de ensaio é multiplicado pela eficiência relativa de clonagem da cultura de ensaio no momento da seleção de mutantes e expresso em relação à eficiência de clonagem da amostra de controlo negativa/solvente (Clive e Spector, 1975).

Controlo do solvente: Termo geral que define as culturas de controlo tratadas apenas com o solvente utilizado para dissolver o produto químico em estudo.

Eficiência de clonagem: Percentagem de células incubadas em placas em baixa densidade que consegue originar uma colónia que pode ser contada.

Frações de fígado S9: Sobrenadante após centrifugação a 9 000 g do homogeneizado hepático (extrato de fígado em bruto).

Frequência de mutação (MF): Relação entre o número de células mutantes observadas e o número de células viáveis.

Genotóxico: Termo geral que abrange todos os tipos de danos ao ADN ou aos cromossomas, incluindo quebra do ADN, aduções, rearranjos, mutações, aberrações cromossómicas e aneuploidia. Nem todos os tipos de efeitos genotóxicos originam mutações ou danos cromossómicos estáveis.

Mistura S9: Mistura da fração de fígado S9 e dos cofatores necessários à atividade enzimática metabólica.

Mutação para diante: Uma mutação genética do tipo parental para a forma mutante que causa uma alteração ou perda de atividade enzimática da função da proteína codificada.

▼M8

Mutagéneos por deslocação do quadro de leitura: Produtos químicos que causam a adição ou supressão de um par de bases ou de uma sequência de pares de bases do ADN.

Mutagéneos por substituição de um par de bases: Produtos químicos que causam a substituição de pares de bases do ADN.

Mutagénico: Que produz uma alteração hereditária de sequências de pares de bases do ADN em genes ou da estrutura dos cromossomas (aberrações cromossómicas).

Período de expressão fenotípica: Período após o tratamento durante o qual a modificação genética é fixada no genoma e os produtos dos genes inalterados se esgotam ao ponto de alterar o caráter fenotípico.

Produto químico: uma substância ou mistura.

Produto químico em estudo: Qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado o presente método de ensaio.

Recombinação mitótica: Recombinação entre cromatídeos homólogos durante a mitose, eventualmente resultante na indução de quebras em cadeias duplas do ADN ou numa perda de heterozigotia.

Sobrevivência relativa (RS): Utilizada para medir a citotoxicidade do TK6 decorrente da exposição. Consiste na eficiência de clonagem (CE) relativa de células colocadas em placas imediatamente após o tratamento, ajustada por qualquer perda de células durante o tratamento, em comparação com a eficiência de clonagem do controlo negativo.

▼M8

Apêndice 2

FÓRMULAS

Citotoxicidade

Para ambas as versões do MLA (ágar e micropoço)

A citotoxicidade é definida como o crescimento total relativo (RTG), que abrange o crescimento relativo em suspensão (RSG) durante o período de expressão de 2 dias e a eficiência de clonagem relativa (RCE) obtida no momento da seleção de mutantes. O RTG, a RSG e a RCE são expressos em percentagem.

Cálculo da RSG: O crescimento em suspensão 1 (SG_1) é a taxa de crescimento entre o dia 0 e o dia 1 (concentração celular no dia 1 / concentração celular no dia 0); o crescimento em suspensão dois (SG_2) é a taxa de crescimento entre o dia 1 e o dia 2 (concentração celular no dia 2 / concentração celular no dia 1). O RSG é o SG total ($SG_1 \times SG_2$) da cultura tratada em relação ao controlo sem tratamento/do solvente. Ou seja: $RSG = [SG_{1(ensaio)} \times SG_{2(ensaio)}] / [SG_{1(controlo)} \times SG_{2(controlo)}]$ O SG_1 deve ser calculado a partir da concentração inicial de células utilizada no início do tratamento celular. Quantifica qualquer citotoxicidade diferencial que ocorra na(s) cultura(s) de ensaio durante o tratamento das células.

A RCE é a eficiência relativa de clonagem da cultura de ensaio comparada com a eficiência relativa de clonagem da amostra de controlo não tratada/de solvente obtida no momento da seleção de mutantes.

Crescimento total relativo (RTG): $RTG=RSG \times RCE$

TK6

Sobrevivência relativa (RS):

A citotoxicidade é avaliada pela sobrevivência relativa, ou seja, a eficiência de clonagem (CE) de células colocadas em placas imediatamente após o tratamento, ajustada por eventuais perdas de células durante este, em comparação com a eficiência de clonagem nos controlos negativos (sobrevivência de 100 %). O ajustamento pela perda de células durante o tratamento é calculado do seguinte modo:

$$\text{CE ajustado} = \text{CE} \times \frac{\textit{Número de células no final do tratamento}}{\textit{Número de células no início do tratamento}}$$

A RS de uma cultura tratada pelo produto químico em estudo é calculada do seguinte modo:

$$RS = \frac{\textit{CE ajustado da cultura tratada}}{\textit{CE ajustado do controlo do solvente}} \times 100$$

Frequência de mutação para o MLA e o ML6

A frequência de mutação (MF) é a eficiência de clonagem de colónias mutantes em meio seletivo (CE_M) ajustada pela eficiência de clonagem em meio não seletivo no momento da seleção de mutantes (CE_V). Ou seja, $MF=CE_M/CE_V$. O cálculo destas duas eficiências de clonagem para os métodos de clonagem do ágar e dos micropoços é descrito a seguir.

▼**M8**

MLA versão ágar: Na versão de ágar macio do MLA, o número de colónias na placa de seleção de mutantes (C_M) e o número de colónias na placa de não seleção ou de eficiência da clonagem (contagem viável) (C_V) são obtidos através da contagem direta dos clones. Quando houver 600 células em placas para eficiência de clonagem (CE) para a seleção de mutantes (CE_M) e as placas não selecionadas ou de eficiência de clonagem (contagem viável) (CE_V) e 3×10^6 células forem utilizadas para a seleção de mutantes,

$CE_M = C_M / (3 \times 10^6) = (C_M / 3) \times 10^{-6}$

$CE_V = C_V / 600$

MLA e TK6 versão micropoços: Na versão micropoços dos MLA, a C_M e a C_V são definidas como o produto do número total de micropoços (TW) e o número provável de colónias por poço (P) nas placas de micropoços.

$C_M = P_M \times TW_M$

$C_V = P_V \times TW_V$

A partir do termo zero da distribuição de Poisson (Furth *et al*., 1981), o P é dado por

$P = - \ln (EW / TW)$

Em que EW são os poços vazios e TW são os poços totais. Portanto,

$CE_M = C_M / T_M = (P_M \times TW_M) / T_M$

$CE_V = C_V / T_V = (P_V \times TW_V) / T_V$

Para a versão micropoços do MLA, as frequências de mutação das colónias pequenas e grandes serão calculadas de modo idêntico, utilizando o número de poços vazios tanto para as pequenas como para as grandes colónias.

No caso do TK6, as frequências de mutação das pequenas e grandes colónias baseiam-se nos mutantes precoces e tardios.

▼M8

B.68. **MÉTODO DE ENSAIO IN VITRO DE EXPOSIÇÃO DE CURTA DURAÇÃO PARA IDENTIFICAR i) PRODUTOS QUÍMICOS INDUTORES DE LESÕES OCULARES GRAVES E ii) PRODUTOS QUÍMICOS QUE NÃO NECESSITAM DE SER CLASSIFICADOS EM TERMOS DE IRRITAÇÃO OCULAR NEM DE LESÕES OCULARES GRAVES**

INTRODUÇÃO

1. O presente método de ensaio é equivalente à *Test Guideline* (TG) 491 (2017) da OCDE. O método de ensaio de exposição de curta duração (STE) é um método *in vitro* que pode ser utilizado, em determinadas circunstâncias e com limitações específicas, para a classificação e rotulagem de perigo de produtos químicos (substâncias e misturas) que provoquem danos oculares graves, bem de produtos químicos que não necessitem de classificação no que diz respeito quer a lesões oculares graves quer a irritação ocular, tal como definido no Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos da ONU (GHS) (1) e no Regulamento (UE) n.º 1272/2008 da União Europeia relativo à classificação, rotulagem e embalagem de substâncias e misturas (CRE) ([1]).

2. Durante muitos anos, o potencial de perigosidade ocular dos produtos químicos foi avaliado essencialmente com recurso a um ensaio ocular *in vivo* no coelho (método de ensaio B.5 (8), equivalente à *Test Guideline* 405 da OCDE). É geralmente aceite que, num futuro previsível, nenhum ensaio *in vitro* alternativo isolado poderá substituir integralmente o ensaio ocular *in vivo* no coelho por forma a prever toda a gama de reações de lesões oculares graves ou irritação ocular das diferentes classes de produtos químicos. No entanto, combinações estratégicas de métodos de ensaio alternativos utilizados numa estratégia de ensaio (sequencial) podem conseguir substituir integralmente o ensaio ocular no coelho (2). A abordagem descendente foi concebida para o ensaio de produtos químicos que, previsivelmente, com base nas informações existentes, têm um elevado potencial de irritação ou de indução de lesões oculares graves. Por outro lado, a abordagem ascendente foi concebida para o ensaio de produtos químicos que, previsivelmente, com base nas informações existentes, não causam irritação ocular suficiente para deverem ser classificadas. Embora não se considere um substituto integral do ensaio ocular *in vivo* no coelho, o método de ensaio STE é adequado para ser utilizado, no âmbito de uma estratégia de ensaio sequencial para a classificação e rotulagem regulamentares, como a abordagem descendente/ascendente, para identificar, sem ensaios complementares: i) produtos químicos indutores de lesões oculares graves (categoria 1 do sistema GHS da ONU/CRE); ii) produtos químicos (excluindo substâncias altamente voláteis e todos os sólidos não tensioativos) que não necessitem de ser classificados em termos de irritação ocular ou de lesões oculares graves (nenhuma categoria do sistema GHS da ONU/CRE) (1) (2). No entanto, para se estabelecer uma classificação definitiva de um produto químico que, previsivelmente, não provoque lesões oculares graves (categoria 1 do sistema GHS da ONU/CRE) ou não pertença a nenhuma categoria GHS da ONU/CRE (não induz lesões oculares graves nem irritação ocular) de acordo com o método de ensaio STE, será necessário realizar ensaios complementares. Além disso, as entidades reguladoras competentes devem ser consultadas antes de se utilizar a STE numa abordagem ascendente ao abrigo de outros sistemas de classificação que não o GHS da ONU/CRE. A escolha do método de ensaio mais adequado e a utilização do presente método de ensaio devem ser vistos no contexto do documento de orientação da OCDE sobre as abordagens integrada de ensaio e avaliação de lesões oculares graves e de irritação ocular (14).

3. O presente método de ensaio tem por objetivo descrever os procedimentos utilizados para avaliar o potencial de perigosidade ocular de um produto químico em estudo, com base na sua capacidade de induzir a citotoxicidade

([1]) Regulamento (CE) n.º 1272/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16 de dezembro de 2008, relativo à classificação, rotulagem e embalagem de substâncias e misturas, que altera e revoga as Diretivas 67/548/CEE e 1999/45/CE, e altera o Regulamento (CE) n.º 1907/2006 (JO L 353 de 31.12.2008, p. 1).

▼M8

no método de ensaio de exposição de curta duração. Os efeitos citotóxicos dos produtos químicos nas células epiteliais da córnea são modos de ação (MOA) importantes que conduzem à deterioração do epitélio da córnea e à irritação ocular. No método STE, a viabilidade celular é avaliada através da medição quantitativa, após extração a partir de células, de sal azul de formazano produzido pelas células vivas através da conversão enzimática do corante vital MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio], também conhecido como brometo de tiazolilo e azul de tetrazólio (3). A viabilidade celular obtida é comparada com o controlo do solvente (viabilidade relativa) e utilizada para estimar o risco ocular potencial do produto químico em estudo. Este é classificado na categoria 1 do sistema GHS da ONU/CRE quando concentrações de 5 % e 0,05 % resultam numa uma viabilidade celular igual ou inferior a 70 %. Inversamente, um produto químico é classificado como pertencente a «nenhuma categoria» no sistema GHS da ONU/CRE quando concentrações de 5 % e 0,05 % resultam numa uma viabilidade celular superior a 70 %.

4. A expressão «produto químico em estudo» é utilizada no presente método de ensaio para referir o produto que está a ser estudado, não remetendo para a aplicabilidade do método de ensaio STE ao estudo de substâncias e/ou misturas. Para definições, consultar o apêndice.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES

5. O presente método de ensaio baseia-se num protocolo desenvolvido pela Kao Corporation (4) que foi objeto de dois estudos de validação diferentes: um do Validation Committee of the Japanese Society for Alternative to Animal Experiments (JSAAE) (5) e outro do Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM) (6). Com base nos relatórios dos estudos de validação e nos documentos-base de recensão sobre o método de ensaio (7), o NICEATM/ICCVAM realizou uma avaliação por pares.

6. Quando utilizados para identificar produtos químicos (substâncias e misturas) indutores de lesões oculares graves (categoria 1 do sistema GHS da ONU/CRE) (1), os dados obtidos com o método de ensaio STE em 125 produtos químicos (incluindo substâncias e misturas) apresentaram uma exatidão global de 83 % (104/125), uma taxa de falsos positivos de 1 % (1/86) e uma taxa de falsos negativos de 51 % (20/39) em relação ao ensaio ocular *in vivo* no coelho (7). A taxa de falsos negativos obtida não é crítica no atual contexto, uma vez que todos os produtos químicos que induzem uma viabilidade celular igual ou inferior a 70 % a uma concentração de 5 % e uma viabilidade celular superior a 70 % a uma concentração de 0,05 % são depois estudados por outros métodos de ensaio *in vitro* devidamente validados ou, como última opção, no ensaio ocular *in vivo* no coelho, consoante os requisitos regulamentares e em conformidade com a estratégia de ensaio sequencial e com as abordagens de ponderação da suficiência da prova atualmente recomendadas (1) (8). Foram ensaiadas, principalmente, substâncias monocomponentes, embora exista também uma quantidade limitada de dados sobre o ensaio de misturas. Considera-se, porém, que o método é tecnicamente aplicável ao ensaio de substâncias e misturas multicomponentes. Contudo, antes da sua aplicação a uma mistura para obter dados com fins regulamentares, importa ponderar se — e, em caso afirmativo, por que motivo — o método pode proporcionar resultados adequados para o efeito. Tais considerações não são necessárias se existir um requisito regulamentar para o ensaio da mistura. O método de ensaio STE não revelou quaisquer outras deficiências específicas quando utilizado para identificar produtos químicos em estudo como pertencentes à categoria 1 do sistema GHS da ONU/CRE. Os investigadores podem ponderar a utilização do presente método de ensaio com produtos químicos em estudo em que uma viabilidade celular $\leq$ 70 %, tanto numa concentração de 5 % como numa concentração de 0,05 %, deve ser aceite como indicativa de uma resposta que induz danos oculares graves, que devem ser classificados na categoria 1 do sistema GHS da ONU/CRE, sem mais ensaios.

▼**M8**

7. Quando utilizados para identificar produtos químicos (substâncias e misturas) indutores de lesões oculares graves (nenhuma categoria do sistema GHS da ONU/CRE), os dados obtidos com o método de ensaio STE em 130 produtos químicos (incluindo substâncias e misturas) apresentaram uma exatidão global de 85 % (110/130), uma taxa de falsos positivos de 12 % (9/73) e uma taxa de falsos negativos de 19 % (11/57) em relação ao ensaio ocular *in vivo* no coelho (7). Se se excluírem do conjunto de dados as substâncias altamente voláteis e as substâncias sólidas não tensioativas, a exatidão global sobe para 90 % (92/102), a taxa de falsos negativos desce para 2 % (1/54) e a de falsos positivos para 19 % (9/48) (7). Assim, as possíveis deficiências do método de ensaio STE, quando utilizado para identificar produtos químicos em estudo que não necessitem de classificação em termos de irritação ocular nem de lesões oculares graves (nenhuma categoria no sistema GHS da ONU/CRE), consistem numa elevada taxa de falsos negativos para: i) substâncias altamente voláteis com uma pressão de vapor superior a 6 kPa; ii) produtos químicos sólidos (substâncias e misturas), com exceção dos tensioativos e das misturas constituídas apenas por tensioativos. Estes produtos químicos estão excluídos do domínio de aplicabilidade do método de ensaio STE (7).

8. Além dos produtos químicos referidos nos pontos 6 e 7, o conjunto de dados gerado pelo método de ensaio STE contém também dados obtidos internamente relativos a 40 misturas, que, em comparação com o ensaio ocular de Draize *in vivo*, revelaram, na avaliação de misturas que não necessitam de classificação nos sistemas de classificação GHS da ONU/CRE (9), uma exatidão de 88 % (35/40), uma taxa de falsos positivos de 50 % (5/10) e uma taxa de falsos negativos de 0 % (0/30). Por conseguinte, o método de ensaio STE pode ser aplicado para identificar misturas como não pertencentes a nenhuma categoria no sistema GHS da ONU/CRE, numa abordagem ascendente, excetuando-se as misturas sólidas que não sejam constituídas apenas por tensioativos, na esteira da limitação relativa a substâncias sólidas. Além disso, as misturas que contenham substâncias com uma pressão de vapor superior a 6kPa devem ser avaliadas com precaução, a fim de evitar eventuais subavaliações, devendo a sua avaliação ser justificada caso a caso.

9. O método de ensaio STE não pode ser utilizado para identificar produtos químicos em estudo como pertencentes à categoria 2, à categoria 2A (irritação ocular) ou à categoria 2B (irritação ocular suave) do sistema GHS da ONU/CRE, devido ao número considerável de produtos químicos da categoria 1 do sistema GHS da ONU/CRE subavaliados como pertencentes às categorias 2, 2A ou 2B e de produtos químicos não pertencentes a nenhuma categoria do GHS da ONU/CRE sobreavaliados como pertencentes às categorias 2, 2A ou 2B (7). Nesses casos, podem ser necessários ensaios complementares por outro método que seja adequado.

10. O método de ensaio STE é adequado para o ensaio de produtos químicos dissolvidos ou suspensos uniformemente durante, pelo menos, 5 minutos em soro fisiológico, de solução salina de dimetilsulfóxido (DMSO) a 5 %ou em óleo mineral. Não é adequado para o ensaio de produtos químicos insolúveis ou que não possam ser suspensos uniformemente durante, pelo menos, 5 minutos em soro fisiológico, solução salina de DMSO a 5 % ou em óleo mineral. A utilização de óleo mineral no método de ensaio STE é possível devido à exposição de curta duração. Por conseguinte, o método é adequado para prever o potencial de perigosidade ocular de produtos químicos em estudo insolúveis na água (p. ex., álcoois gordos de cadeia longa ou cetonas), desde que sejam miscíveis em, pelo menos, um dos três solventes supramencionados (4).

▼M8

11. A expressão «produto químico em estudo» utilizada no presente método de ensaio designa o produto que está a ser estudado [1], não abrangendo a aplicabilidade do método de ensaio STE ao ensaio de substâncias e/ou misturas.

PRINCÍPIO DO ENSAIO

12. O método de ensaio STE é um ensaio de toxicidade *in vitro* realizado numa única camada confluente de células Statens Seruminstitut Cornea (SIRC) cultivadas numa microplaca de policarbonato com 96 poços (4). Após cinco minutos de exposição ao produto químico em estudo, a citotoxicidade é medida quantitativamente como a viabilidade relativa das células SIRC, por recurso ao ensaio do MTT (4). A viabilidade celular reduzida é utilizada para prever potenciais efeitos nocivos indutores de danos oculares.

13. Encontra-se referenciado que 80 % de uma solução que caia no olho de um coelho são excretados através do saco conjuntival nos três-quatro minutos seguintes, enquanto mais de 80 % de uma solução que caia no olho humano são excretados em 1 a 2 minutos (10). O método de ensaio STE procura aproximar estes tempos de exposição e utiliza a citotoxicidade como parâmetro para avaliar a extensão dos danos causados às células SIRC após cinco minutos de exposição ao produto químico em estudo.

DEMONSTRAÇÃO DE COMPETÊNCIA TÉCNICA

14. Antes de utilizarem de forma rotineira o método de ensaio STE descrito, os laboratórios devem demonstrar a sua competência técnica, classificando corretamente as onze substâncias recomendadas no quadro 1. Estas substâncias foram selecionadas para representar a gama completa de reações de lesão ocular grave ou irritação ocular com base nos resultados de ensaios oculares *in vivo* no coelho (TG 405) e no sistema de classificação GHS da ONU/CRE (1). Outros critérios de seleção incluíam a disponibilidade comercial das substâncias, a disponibilidade de dados de referência *in vivo* de elevada qualidade e a existência de dados *in vitro* de alta qualidade relativos ao método de ensaio STE (3). Nas situações em que uma substância incluída na lista esteja indisponível ou sempre que se justifique, podem utilizar-se outras substâncias para as quais estejam disponíveis dados de referência *in vivo* e *in vitro* adequados, desde que se apliquem os critérios descritos.

Quadro 1

Lista de substâncias para demonstração de competência técnica

Substância	N.º CAS	Classe química [1]	Estado físico	Cat. *in vivo* do GHS da ONU/CRE [2]	Solvente no ensaio STE	Categoria STE do GHS da ONU/CRE
Cloreto de benzalcónio (sol. aquosa a 10 %)	8001-54-5	Sal de amónio quaternário	Líquido	Categoria 1	Salino	Categoria 1
Triton X-100 (100 %)	9002-93-1	Éter	Líquido	Categoria 1	Salino	Categoria 1

[1] Em junho de 2013, a reunião conjunta acordou que, sempre que possível, nos métodos de ensaio novos e atualizados, a expressão «produto químico em estudo» deveria, passar a ser utilizada de forma mais coerente, para descrever o objeto do estudo.

▼**M8**

Substância	N.º CAS	Classe química (1)	Estado físico	Cat. *in vivo* do GHS da ONU/ /CRE (2)	Solvente no ensaio STE	Categoria STE do GHS da ONU/CRE
Vermelho ácido 92	18472-87-2	Composto heterocíclico; composto de bromo; composto de cloro	Sólido	Categoria 1	Salino	Categoria 1
Hidróxido de sódio	1310-73-2	Alcalinos; produtos químicos inorgânicos	Sólido	Categoria 1 (3)	Salino	Categoria 1
Butirolactona	96-48-0	Lactona; composto heterocíclico	Líquido	Categoria 2A (categoria 2 do CRE)	Salino	Previsão impossível
1-Octanol	111-87-5	Álcool	Líquido	Categoria 2A/ /B (4)(categoria 2 do CRE)	Óleos minerais	Previsão impossível
Ciclopentanol	96-41-3	Álcool; Hidrocarboneto cíclico	Líquido	Categoria 2A/ /B (5) (categoria 2 do CLP)	Salino	Previsão impossível
Acetato de 2-etoxietilo	111-15-9	Álcool; éter	Líquido	Nenhuma categoria	Salino	Nenhuma categoria
Dodecano	112-40-3	Hidrocarboneto acíclico	Líquido	Nenhuma categoria	Óleos minerais	Nenhuma categoria
Metilisobutilcetona	108-10-1	Cetona	Líquido	Nenhuma categoria	Óleos minerais	Nenhuma categoria

▼M8

Substância	N.º CAS	Classe química (1)	Estado físico	Cat. *in vivo* do GHS da ONU/ /CRE (2)	Solvente no ensaio STE	Categoria STE do GHS da ONU/CRE
Sulfato de 1,1-dimetilguanidina	598-65-2	Amidina; composto de enxofre	Sólido	Nenhuma categoria	Salino	Nenhuma categoria

(1) As classes de produtos químicos foram atribuídas com recurso a informações obtidas de publicações anteriores do NICEATM e, se não disponíveis, com recurso à National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH®) (via ChemIDplus® [National Library of Medicine], disponível em http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/), bem como às determinações estruturais efetuadas pelo NIECEATM.

(2) Com base nos resultados do ensaio ocular *in vivo* no coelho (*Test Guideline* 405 da OCDE) e utilizando o sistema GHS da ONU/CRE (1).

(3) A classificação na cat. 1 é baseada no potencial de corrosão da pele de 100 % do hidróxido de sódio (apresentado como um produto químico para demonstração de competência técnica com potencial de corrosão da pele na *Test Guideline* 435 da OCDE) e nos critérios aplicáveis à categoria 1 do sistema GHS da ONU/CRE (1).

(4) A classificação como categoria 2A ou 2B depende da interpretação do critério do sistema GHS da ONU para distinguir estas duas categorias; isto é, 2 em 6 ou 4 em 6 animais com efeitos no 7.º dia necessários para uma classificação na categoria 2A. O conjunto de dados *in vivo* incluiu 2 estudos com 3 animais cada um. Num estudo, dois dos três animais revelaram efeitos no sétimo dia que justificaram a classificação na cat. 2A (11), enquanto no segundo estudo todos os parâmetros dos três animais recuperaram para uma pontuação igual a zero até ao sétimo dia, o que justificou a classificação na cat. 2B (12).

(5) A classificação na categoria 2A ou 2B depende da interpretação do critério do sistema GHS da ONU para distinguir estas categorias: se para a classificação na categoria 2A poder ser atribuída é necessário que 1 em 3 ou 2 em 3 animais exibam efeitos ao sétimo dia. O estudo *in vivo* incidiu em 3 animais. Num animal, todos os parâmetros, à exceção da opacidade da córnea e da vermelhidão da conjuntiva, recuperaram para uma pontuação igual a zero até ao dia 7 ou antes. O único animal que não recuperou completamente até ao dia 7 tinha uma pontuação de opacidade da córnea de 1 e uma vermelhidão da conjuntiva de 1 (no dia 7), que estavam completamente recuperadas no dia 14 (11).

Abreviaturas: N.º de registo CAS = Número de registo do Chemical Abstracts Service

PROCEDIMENTO

Preparação da monocamada celular

15. Para a realização do ensaio STE, deve utilizar-se a linha celular SIRC da córnea do coelho. Recomenda-se que as células SIRC provenham de um banco de células devidamente qualificado, como o American Type Culture Collection CCl60.

16. As células SIRC são cultivadas a 37 °C, numa atmosfera humidificada com 5 % de CO_2, num balão de cultura com um meio de cultura constituído por meio mínimo essencial de Eagle (MEM) complementado com 10 % de soro fetal bovino (FBS), 2 mM de L-glutamina, 50-100 unidades/ml de penicilina e 50-100 µg/ml de estreptomicina. As células que se tenham tornado confluentes no frasco de cultura devem ser separadas por meio da solução de tripsina-ácido etilenodiaminotetracético, com ou sem recurso a um raspador. As células são propagadas (2 a 3 passagens) num recipiente de cultura antes de serem utilizadas em ensaios de rotina, não devendo ser objeto de mais de 25 passagens desde a descongelação.

17. As células prontas a utilizar no ensaio STE são preparadas à densidade adequada e inoculadas em placas de 96 poços. A densidade de inoculação das células recomendada é de $6{,}0 \times 10^3$ células por poço, se as células forem utilizadas quatro dias após a inoculação, ou de $3{,}0 \times 10^3$ células por poço, se forem utilizadas cinco dias após a inoculação, num volume de cultura de 200 µl. As células utilizadas para o ensaio STE que sejam inoculadas num meio de cultura com a densidade adequada atingirão uma confluência superior a 80 % no momento do ensaio, isto é, quatro ou cinco dias após a inoculação.

Aplicação dos produtos químicos em estudo e de controlo

18. A primeira escolha do solvente para dissolução ou suspensão dos produtos químicos em estudo é uma solução de soro fisiológico. Se o produto apresentar uma baixa solubilidade ou não puder ser dissolvido ou suspenso uniformemente durante, pelo menos, cinco minutos em soro fisiológico, utiliza-se, como segunda opção, DMSO (n.º CAS 67-68-5) a 5 % em soro

▼M8

fisiológico. Caso os produtos químicos em estudo não possam ser dissolvidos ou suspensos de modo uniforme durante, pelo menos, cinco minutos soro fisiológico ou em DMSO a 5 % em soro fisiológico, utiliza-se óleo mineral (n.º CAS 8042-47-5) como terceira opção.

19. Os produtos químicos em estudo são dissolvidos ou suspensos uniformemente no solvente selecionado, a uma concentração de 5 % (m/m), e novamente diluídos numa diluição sequencial de fator 10 até 0,5 % e uma concentração de 0,05 %. Cada produto químico em estudo deve ser ensaiado a concentrações de 5 % e 0,05 %. As células cultivadas na placa de 96 poços são expostas a 200 µl/poço de uma concentração da solução (ou suspensão) do produto químico em estudo de 5 % ou de 0,05 %, durante 5 minutos à temperatura ambiente. Os produtos químicos em estudo (substâncias monocomponentes ou substâncias ou misturas multicomponentes) são considerados substâncias puras, sendo diluídos ou suspensos de acordo com o método, independentemente do seu grau de pureza.

20. Utiliza-se como meio de controlo, em cada placa de cada réplica, o meio de cultura descrito no ponto 16. Além disso, as células devem ser expostas também a amostras de controlo de solvente em cada uma das placas de cada réplica. Está confirmado que os solventes enumerados no ponto 18 não têm efeitos nocivos na viabilidade das células SIRC.

21. No método de ensaio STE, utiliza-se uma solução salina a 0,01 % de laurilsulfato de sódio como controlo positivo em cada réplica. A fim de calcular a viabilidade celular do controlo positivo, cada placa de cada réplica deve incluir também um controlo do solvente salino.

22. É necessário um ensaio em branco para determinar a compensação por densidade ótica, ensaio esse que deve ser realizado em poços contendo apenas solução salina tamponada de fosfatos (PBS), mas sem cálcio e magnésio (PBS-) nem células.

23. Cada amostra (produto químico em estudo a 5 % e 0,05 %, controlo de meio, controlo do solvente e controlo positivo) deve ser ensaiada em triplicado em cada réplica, expondo as células a 200 µl do produto químico em estudo ou de controlo, durante 5 minutos, à temperatura ambiente.

24. As substâncias de referência são úteis para avaliar o potencial de irritação ocular de produtos químicos desconhecidos de uma determinada classe química – ou classe de produtos – e para avaliar o potencial de irritação relativo de uma substância irritante ocular numa determinada gama de reações de irritação.

Medição da viabilidade celular

25. Após a exposição, as células são lavadas duas vezes com 200 µl de PBS e adicionam-se 200 µl de solução de MTT (0,5 mg de MTT/ml de meio de cultura). Após um período de reação de duas horas numa incubadora (37 °C, 5 % de CO_2), a solução de MTT é decantada, o MTT formazano é extraído durante 60 minutos através da adição de 200 µl de 0,04 N ácido clorídrico--isopropanol, ao abrigo da luz e à temperatura ambiente, medindo-se a absorvância da solução de MTT formazano a 570 nm, com um leitor de placas. A interferência de produtos químicos em estudo com o ensaio do MTT (por corantes ou redutores diretos do MTT) só ocorre se uma quantidade significativa do produto químico em estudo ficar retida no sistema de ensaio após a lavagem subsequente à exposição, o que acontece com córnea humana reconstruída em 3D ou com tecidos da epiderme humana reconstruídos, mas não é relevante para culturas de células 2D utilizadas para o método de teste STE.

▼M8

Interpretação dos resultados e modelo de previsão

26. Utilizam-se os valores da densidade ótica (DO) obtidos para cada produto químico em estudo para calcular a viabilidade celular em relação ao controlo do solvente, que é fixada em 100 %. A viabilidade celular relativa é expressa em percentagem e obtida dividindo a densidade ótica do produto químico em estudo pela densidade ótica do controlo do solvente depois de subtrair a densidade ótica do produto em branco de ambos os valores.

$$Viabil.cel.(\%) = \frac{(DO_{570}\ prod.quím.estudo) - (DO_{570}\ de\ vazio)}{(DO_{570}\ do\ controlo\ do\ solvente) - (DO_{570}\ de\ vazio)} \times 100$$

Do mesmo modo, a viabilidade celular relativa de cada controlo de solvente é expressa em percentagem e obtida dividindo a densidade ótica do controlo do solvente pela densidade ótica do controlo do meio, após subtração da densidade ótica do branco a ambos os valores.

27. Devem realizar-se três repetições independentes, cada uma das quais com três poços replicados (ou seja, n = 9). A média aritmética dos três poços de cada produto químico em estudo e do controlo do solvente em cada réplica independente é utilizada para calcular a média aritmética da viabilidade celular relativa. A média aritmética final da viabilidade celular é calculada a partir das três repetições independentes.

28. Apresentam-se a seguir os valores-limite de viabilidade celular para a identificação de produtos químicos indutores de lesões oculares graves (categoria 1 do sistema GHS da ONU/CRE) e de produtos químicos que não necessitem de ser classificados em termos de irritação ocular nem de lesões oculares graves (nenhuma categoria no sistema GHS da ONU/CRE).

Quadro 2

Modelo de previsão do método de ensaio STE

Viabilidade celular		Classificação GHS da ONU/CRE	Aplicabilidade
A 5 %	A 0,05 %		
> 70 %	> 70 %	Nenhuma categoria	Substâncias e misturas, com exceção de: i) Substâncias altamente voláteis com uma pressão de vapor superior a 6 kPa (1) e ii) Produtos químicos sólidos (substâncias e misturas), com exceção dos tensioativos e das misturas constituídas apenas por tensioativos
≤ 70 %	> 70 %	Previsão impossível	Não aplicável
≤ 70 %	≤ 70 %	Categoria 1	Substâncias e misturas (2)

(1) As misturas que contenham substâncias com uma pressão de vapor superior a 6 kPa devem ser avaliadas com precaução, a fim de evitar eventuais subavaliações, devendo a sua avaliação ser justificada caso a caso.

(2) Com base nos resultados obtidos principalmente com substâncias monocomponentes, embora exista também uma quantidade limitada de dados sobre o ensaio de misturas. Considera-se, porém, que o método é tecnicamente aplicável ao ensaio de substâncias e misturas multicomponentes. Antes da aplicação do método a uma mistura para obter dados com fins regulamentares, importa ponderar se (e, em caso afirmativo, por que motivo) o método pode proporcionar resultados adequados para o efeito. Essas considerações não são necessárias se existir um requisito normativo para o ensaio da mistura.

▼M8

Critérios de aceitação

29. Os resultados dos ensaios são considerados aceitáveis se forem cumpridos os seguintes critérios:

a) A densidade ótica do controlo do meio (exposto ao meio de cultura) deve ser igual ou superior a 0,3 após dedução da densidade ótica do branco.

b) A viabilidade do controlo do solvente deve ser igual ou superior a 80 % do controlo do meio. Caso se utilizem vários controlos de solvente em cada repetição, cada um desses controlos deve indicar uma viabilidade celular superior a 80 % para qualificar os produtos químicos em estudo ensaiados com esses solventes.

c) A viabilidade celular obtida com o controlo positivo (0,01 % SLS) deve situar-se no intervalo de dois desvios-padrão da média histórica. Os limites superior e inferior de aceitação do controlo positivo devem ser atualizados com frequência, ou seja, de três em três meses ou sempre que se realize um ensaio aceitável num laboratório que efetue ensaios com pouca frequência (ou seja, menos de uma vez por mês). Caso um laboratório não realize um número de experiências suficiente para estabelecer uma distribuição de controlo positiva estatisticamente sólida, é aceitável que se utilizem os limites superior e inferior de aceitação estabelecidos pelo criador do método, ou seja, entre 21,1 % e 62,3 %, de acordo com os seus dados históricos de laboratório, enquanto uma distribuição interna é construída durante os primeiros ensaios de rotina.

d) O desvio-padrão da viabilidade celular final derivado de três repetições independentes deve ser inferior a 15 % para as concentrações de 5 % e 0,05 % do produto químico em estudo.

Se um ou mais destes critérios não forem cumpridos, os resultados devem ser rejeitados e deve proceder-se a três novas repetições independentes.

DADOS E RELATÓRIOS

Dados

30. Devem comunicar-se os dados relativos a cada poço individual (por exemplo, valores de viabilidade celular) de cada repetição, bem como a média global, o DP e a classificação.

Relatório de ensaio

31. O relatório do ensaio deve incluir as seguintes informações:

Produto químico em estudo e substâncias de controlo

— Substâncias monocomponentes: dados de identificação química, como as denominações IUPAC ou CAS, o(s) número(s) de registo CAS, o código SMILES ou InChI, a fórmula estrutural e/ou outros elementos de identificação;

— Substância multicomponentes, UVCB e mistura: Caracterização, tanto quanto possível — por exemplo, por identidade química (ver *supra*), pureza, ocorrência quantitativa e principais propriedades físico-químicas (ver *supra*) dos componentes, na medida em que estejam disponíveis;

— Estado físico, volatilidade, pH, log(P), peso molecular, classe química e outras propriedades físico-químicas pertinentes para a realização do estudo, na medida em que estejam disponíveis;

▼**M8**

— Grau de pureza, identidade química das impurezas, conforme adequado e exequível, etc.;

— Pré-tratamento, se for o caso (aquecimento ou moagem, por exemplo);

— Condições de armazenagem e de estabilidade, se conhecidas.

Condições e procedimentos do método de ensaio

— Nome e endereço do patrocinador, do laboratório e do diretor do estudo;

— Descrição do método de ensaio utilizado;

— Linha celular utilizada, origem, número de passagens e confluência das células utilizadas para o ensaio;

— Pormenores sobre o protocolo de ensaio seguido;

— Número de réplicas e replicados utilizados;

— Concentrações do produto químico em estudo utilizadas (se diferentes das recomendadas);

— Condições de armazenagem e de estabilidade, se conhecidas;

— Tempo de exposição ao produto químico em estudo (se diferente do recomendado);

— Descrição de eventuais modificações do protocolo do ensaio;

— Descrição dos critérios de avaliação e de decisão utilizados;

— Referência à média histórica do controlo positivo e ao desvio-padrão (DP);

— Demonstração da competência técnica do laboratório para executar o método de ensaio (p. ex., ensaio de substâncias utilizadas para demonstrar a competência técnica) ou demonstração da reprodutibilidade do método de ensaio ao longo do tempo.

Resultados

— Para cada produto químico em estudo, cada substância de controlo e cada concentração estudada, deve apresentar-se uma tabela dos valores da densidade ótica por poço replicado, os valores da média aritmética da densidade ótica para cada repetição independente, a percentagem de viabilidade celular para cada repetição independente e a média aritmética final da percentagem de viabilidade celular das três repetições, bem como o desvio-padrão das três repetições;

— Resultados relativos ao meio, ao controlo do solvente e ao controlo positivo que demonstrem o cumprimento dos critérios pertinentes de aceitação do estudo;

— Descrição de outros efeitos eventualmente observados;

— Classificação global atribuída, com menção do modelo de previsão ou dos critérios de decisão utilizados.

▼M8

Discussão dos resultados

Conclusões

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(1) United Nations UN (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Disponível em: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) Scott L, *et al.* (2010). A proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *in vivo* Studies Using Bottom-Up and Top-Down Approaches. *Toxicol. In Vitro* 24, 1-9.

(3) Mosmann T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to 7 Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.

(4) Takahashi Y, *et al.* (2008). Development of the Short Time Exposure (STE) Test: an *In Vitro* Eye Irritation Test Using SIRC Cells. *Toxicol. In Vitro* 22,760-770.

(5) Sakaguchi H, *et al.* (2011). Validation Study of the Short Time Exposure (STE) Test to Assess the Eye Irritation Potential of Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 25,796-809.

(6) Kojima H, *et al.* (2013). Second-Phase Validation of Short Time Exposure Tests for Assessment of Eye Irritation Potency of Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 27, pp.1 855-1 869.

(7) ICCVAM (2013). Short Time Exposure (STE) Test Method Summary Review Document, NIH. Disponível em: [http://www.ntp.niehs.nih.gov//iccvam/docs/ocutox_docs/STE-SRD-NICEATM-508.pdf].

(8) Chapter B.5 of this Annex, Acute Eye Irritation/Corrosion.

(9) Saito K, *et al*. (2015). Predictive Performance of the Short Time Exposure Test for Identifying Eye Irritation Potential of Chemical Mixtures.

(10) Mikkelson TJ, Chrai SS and Robinson JR. (1973). Altered Bioavailability of Drugs in the Eye Due to Drug-Protein Interaction. *J. Pharm*. Sci.1 648-1 653.

(11) ECETOC (1998). Eye Irritation Reference Chemicals Data Bank. Technical Report (No 48. (2)), Brussels, Belgium.

(12) Gautheron P, *et al*. (1992). Bovine Corneal Opacity and Permeability Test: an *In Vitro* Assay of Ocular Irritancy. Fundam Appl *Toxicol.* 18, 442-449.

(13) OCDE (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(14) OCDE (2017). Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 263). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

▼**M8**

Apêndice

DEFINIÇÕES

Abordagem ascendente: Metodologia por etapas utilizada para produtos químicos em estudo que se pense não necessitarem de ser classificados em termos de irritação ocular ou de lesões oculares graves; inicia-se com a determinação de produtos químicos que não careçam de classificação (resultado negativo) a partir de outros produtos químicos (resultado positivo).

Abordagem descendente: Metodologia por etapas utilizada para produtos químicos em estudo que se suspeite causarem lesões oculares graves; inicia-se com a determinação de produtos químicos que induzam lesões oculares graves (resultado positivo) a partir de outros produtos químicos (resultado negativo).

Adequação: Relação do ensaio com o efeito em causa; pertinência e utilidade do ensaio para o fim em vista. Traduz a medida em que o ensaio mede ou prevê corretamente o efeito biológico em apreciação. A adequação compreende a exatidão (concordância) do método de ensaio (10).

Agente tensioativo: Produto químico, como um detergente, capaz de reduzir a tensão superficial dos líquidos, permitindo-lhes formar espumas ou penetrar em sólidos; igualmente designado por «agente molhante».

Amostra de controlo do solvente/veículo: Amostra não tratada que contém todos os componentes do sistema de ensaio, incluindo o solvente ou excipiente, e é ensaiada, juntamente com as amostras tratadas com o produto químico em estudo e as outras amostras de controlo, para estabelecer a linha de base de reação para as amostras tratadas com o produto químico em estudo, dissolvido no mesmo solvente ou excipiente. Quando ensaiada com uma amostra de controlo do meio correspondente, esta amostra também permite determinar se o solvente ou o veículo interage com o sistema de ensaio.

Categoria 1 do sistema GHS da ONU/CRE: Ver «lesão ocular grave».

Categoria 2 do sistema GHS da ONU/CRE: Ver «irritação ocular».

Controlo do meio: Replicado não tratado que contém todos os componentes do sistema de ensaio. Esta amostra é ensaiada juntamente com as amostras tratadas com o produto químico em estudo e as outras amostras de controlo, para determinar se o solvente interage com o sistema de ensaio.

Controlo positivo: Replicado que contém todos os componentes do sistema de ensaio e foi tratado com uma substância que comprovadamente induz reação positiva. Para que possa determinar-se a variabilidade no tempo da reação a esta amostra de controlo, essa reação não deve ser excessivamente positiva.

DO: Densidade ótica.

Especificidade: Proporção dos produtos químicos negativos/inativos que são corretamente classificados pelo ensaio. Constitui uma medida da exatidão de um método de ensaio cujos resultados sejam estabelecidos em função de categorias e é um aspeto importante a ter em conta na avaliação da adequação do método de ensaio (13).

Estratégia de ensaio sequencial por etapas: Estratégia sequencial de ensaio em que, seguindo uma ordem estabelecida, se avalia toda a informação disponível sobre o produto químico em estudo, por um processo baseado na ponderação da suficiência da prova em cada etapa, com o objetivo de determinar se há dados suficientes para uma decisão de classificação de perigosidade antes de passar à etapa seguinte. Se os dados existentes possibilitarem a atribuição de um potencial de irritação ao produto químico em estudo, não serão necessários mais ensaios. No caso contrário, procede-se a uma série de ensaios sequenciais em animais até ser possível atribuir uma classificação inequívoca.

Exatidão: Grau de acordo entre os resultados do método de ensaio e os valores de referência aceites. Constitui uma medida do desempenho do método e um dos aspetos da sua adequação. Este termo e o termo «concordância» são muitas vezes utilizados indistintamente para indicar a proporção de resultados corretos do método de ensaio (13).

▼M8

Fiabilidade: Medida em que, utilizando o mesmo protocolo, um método de ensaio pode ser continuadamente reproduzido no mesmo laboratório e em laboratórios diferentes. A fiabilidade é avaliada com base nos valores calculados das reprodutibilidades intralaboratorial e interlaboratorial, bem como da repetibilidade intralaboratorial (13).

Irritação ocular: Alteração ocular em consequência da aplicação do produto químico em estudo na superfície anterior do olho, totalmente reversíveis nos 21 dias após a aplicação. Esta expressão e as expressões «efeitos oculares reversíveis» ou «categoria 2 do sistema GHS da ONU/CRE» são utilizados indistintamente.

Lesão ocular grave: Lesão do tecido ocular ou degradação grave da visão devido à aplicação do produto químico em estudo na superfície anterior do olho, não totalmente reversível nos 21 dias após a aplicação. Esta expressão e as expressões «efeitos oculares irreversíveis» ou «categoria 1 do sistema GHS da ONU/CRE» são utilizadas indistintamente.

Mistura: Uma mistura ou solução composta por duas ou mais substâncias.

MTT: Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]; brometo de tiazolilo; azul de tetrazólio.

Nenhuma categoria no sistema GHS da ONU/CRE: Produtos químicos não classificados nas categorias 1 ou 2 (ou categorias 2A ou 2B) do sistema GHS da ONU/CRE.

Perigo: Propriedade intrínseca de um agente, ou de uma situação, suscetível de causar efeitos nocivos num organismo, sistema, população ou subpopulação que seja exposto ao agente em causa.

Produto químico: Uma substância ou mistura.

Produto químico em estudo: Qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado o presente método de ensaio.

Sensibilidade: Proporção dos produtos químicos positivos/ativos que são corretamente classificados pelo ensaio. Constitui uma medida da exatidão de um método de ensaio cujos resultados sejam classificados em função de categorias e é um aspeto importante a ter em conta na avaliação da adequação do método de ensaio (10).

Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos das Nações Unidas (em inglês: Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals – UN GHS): Sistema que propõe a classificação dos produtos químicos (substâncias e misturas) em função de tipos e níveis normalizados de perigos físicos, sanitários e ambientais e trata ainda dos correspondentes elementos de comunicação, como pictogramas, palavras-sinal, advertências de perigo, recomendações de prudência e fichas de dados de segurança, de modo a transmitir informações sobre os efeitos indesejáveis do produto em causa, com vista à proteção das pessoas (empregadores, trabalhadores, transportadores, consumidores, pessoal dos serviços de emergência, etc.) e do ambiente (1).

▼**M8**

Substância: Um elemento químico e os seus compostos, no estado natural ou obtidos por qualquer processo de produção, incluindo qualquer aditivo necessário para preservar a sua estabilidade e qualquer impureza derivada do processo utilizado, mas excluindo qualquer solvente que possa ser separado sem afetar a estabilidade da substância nem modificar a sua composição.

Substância de referência: Substância utilizada como padrão de comparação com o produto químico em estudo. Uma substância de referência deve ter as seguintes características: (i) origem ou origens uniformes e fiáveis; (ii) similaridade estrutural e funcional com a classe de substâncias em estudo; (iii) propriedades físico-químicas conhecidas; (iv) disponibilidade de dados sobre os efeitos conhecidos; e v) potência conhecida, situada na gama de reação pretendida.

Substância monocomponente: Substância, definida pela sua composição quantitativa, na qual um dos principais componentes está presente num teor de, pelo menos, 80 % (m/m).

Substância multicomponentes: Substância, definida pela sua composição quantitativa, da qual mais de um dos principais componentes está presente numa concentração ≥ 10 % (m/m) e < 80 % (m/m). As substâncias multicomponentes resultam de processos de fabrico. A diferença entre uma mistura e uma substância multicomponentes reside no facto de a primeira ser obtida misturando duas ou mais substâncias, sem reação química. As substâncias multicomponentes resultam de reações químicas.

Taxa de falsos negativos: Proporção dos produtos químicos positivos que o método de ensaio considera, erradamente, negativos. É um dos indicadores da eficiência dos métodos de ensaio.

Taxa de falsos positivos: Proporção dos produtos químicos negativos que o método de ensaio considera, erradamente, positivos. É um dos indicadores da eficiência dos métodos de ensaio.

UVCB: Substâncias de composição desconhecida ou variável, produtos de reação complexos ou matérias biológicas.

▼M8

B.69. **MÉTODO DE ENSAIO DO EPITÉLIO HUMANO SIMILAR À CÓRNEA RECONSTRUÍDO (RhCE), PARA IDENTIFICAÇÃO DE PRODUTOS QUÍMICOS QUE NÃO NECESSITAM DE CLASSIFICAÇÃO E ROTULAGEM EM MATÉRIA DE IRRITAÇÃO OCULAR E LESÕES OCULARES GRAVES**

INTRODUÇÃO

1. O presente método de ensaio é equivalente à *Test Guideline* (TG) 492 (2017) da OCDE. Por *lesões oculares graves* entende-se a produção de lesões oculares graves ou uma degradação grave da visão, na sequência da aplicação de um produto químico na superfície anterior do olho, que não sejam totalmente reversíveis nos 21 dias após a aplicação, de acordo com o Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos das Nações Unidas (GHS) (1), e pelo Regulamento (UE) n.º 1272/2008 da União Europeia, relativo à classificação, rotulagem e embalagem de substâncias e misturas (CRE) ([1]). Ainda de acordo com o sistema GHS da ONU e com o CRE, entende-se por *irritação ocular* a produção de alterações no olho, após a aplicação do produto químico em estudo na sua superfície anterior, que são totalmente reversíveis nos 21 dias seguintes à aplicação. Os produtos químicos em estudo que induzem lesões oculares graves são classificados na categoria 1 do sistema GHS da ONU e na categoria 1 do CRE, enquanto os que induzem irritação ocular são classificados na categoria 2 do sistema GHS da ONU e na categoria 2 do CRE. Os produtos químicos em estudo não classificados em termos de irritação ocular nem de lesões oculares graves são definidos como produtos químicos que não preenchem os requisitos para classificação nas categorias 1 ou 2 (2A ou 2B) do sistema de classificação GHS da ONU/CRE, ou seja, são referidos como não pertencendo a «nenhuma categoria» no sistema GHS da ONU/CRE.

2. A avaliação das lesões oculares graves/irritação ocular implica, normalmente, a utilização de animais de laboratório (método de ensaio B.5) (2). A escolha do método de ensaio mais adequado e a utilização do presente método de ensaio devem ser ponderadas no contexto do documento de orientação da OCDE sobre abordagens integradas de ensaio e avaliação de lesões oculares graves e de irritação ocular (39).

3. O presente método de ensaio descreve um procedimento *in vitro* que permite a identificação de produtos químicos (substâncias e misturas) que não necessitam de classificação e rotulagem em termos de irritação ocular nem de lesões oculares graves, em conformidade com o GHS da ONU e com o CRE. Utiliza epitélio humano reconstruído similar à córnea (RhCE), o qual reproduz com rigor as propriedades histológicas, morfológicas, bioquímicas e fisiológicas do epitélio da córnea humana. Quatro outros métodos de ensaio *in vitro* foram validados, considerados cientificamente válidos e adotados como métodos de ensaio B.47 (3), B.48 (4), B.61 (5) e B.68 (6), a fim de resolver a questão do parâmetro «lesões oculares graves/irritação ocular».

4. O presente método inclui dois ensaios validados, comercialmente disponíveis, de RhCE. Realizaram-se estudos de validação para avaliar irritação ocular/lesões oculares graves (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) utilizando os ensaios de irritação ocular EpiOcular™ Eye Irritation Test (EIT) e SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) Eye Irritation Test (EIT). Cada um destes testes utiliza, como sistema de ensaio, construções de tecido RhCE disponíveis no comércio, a seguir referidas como métodos de referência validados – VRM1 e VRM2, respetivamente. A partir destes estudos de

([1]) Regulamento (CE) n.º 1272/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16 de dezembro de 2008, relativo à classificação, rotulagem e embalagem de substâncias e misturas, que altera e revoga as Diretivas 67/548/CEE e 1999/45/CE, e altera o Regulamento (CE) n.º 1907/2006 (JO L 353 de 31.12.2008, p. 1).

▼M8

validação e da sua avaliação independente por pares (9)(12), concluiu-se que o IET EpiOcular™ e o HCE IET SkinEthic™ permitem identificar corretamente os produtos químicos (substâncias e misturas) que, de acordo com o GHS da ONU, não necessitam de classificação e rotulagem em matéria de irritação ocular ou de lesões oculares graves, tendo os ensaios sido recomendados como cientificamente válidos para o efeito (13).

5. É geralmente aceite que, num futuro previsível, nenhum ensaio *in vitro* alternativo isolado poderá substituir integralmente o ensaio ocular pelo método de Draize *in vivo* (2) (14) para prever toda a gama de reações de lesões oculares graves/irritação ocular das diferentes classes de produtos químicos. Porém, a combinação de vários métodos de ensaio alternativos no âmbito de uma estratégia de ensaio ascendente/descendente pode substituir-se ao ensaio ocular pelo método de Draize (15). A abordagem ascendente (15) foi concebida para ser utilizada quando, com base nos dados existentes, se preveja que um produto químico não cause irritação ocular suficiente para necessitar de ser classificado, enquanto a abordagem descendente (15) é concebida para ser utilizada quando, com base nos dados existentes, se preveja que um produto químico cause lesões oculares graves. O EIT EpiOcular™ e o EIT HCE SkinEthic™ são recomendados para a identificação de produtos químicos que não necessitam de classificação para irritação ou lesões oculares graves de acordo com o GHS da ONU/CRE(nenhuma categoria) sem qualquer outro ensaio, no âmbito de uma estratégia como a abordagem ascendente/descendente sugerida por Scott *et al.,* por exemplo, como uma etapa inicial de uma abordagem ascendente ou como uma das últimas etapas de uma abordagem descendente (15). No entanto, o EIT EpiOcular™ e o EIT HCE SkinEthic™ não se destinam a estabelecer uma distinção entre a categoria 1 do sistema GHS da ONU/CRE (lesões oculares graves) e a categoria 2 do sistema GHS da ONU/CRE (irritação ocular). Esta diferenciação terá de ser feita a outro nível da estratégia de ensaio (15). No caso de produtos químicos em estudo identificados como necessitando de classificação para a irritação ocular/lesões oculares graves com o EIT EpiOcular™ ou o EIT HCE SkinEthic™ será, por conseguinte, necessário realizar ensaios complementares (*in vitro* e/ou *in vivo*) para se chegar a uma conclusão definitiva (nenhuma categoria, categoria 2 ou categoria 1 no sistema GHS da ONU/ /CRE), utilizando, por exemplo, os métodos B.47, B.48, B.61 ou B.68.

6. O presente método de ensaio tem por objetivo descrever o procedimento utilizado para avaliar o potencial de perigosidade ocular de um produto químico em estudo, com base na sua capacidade de induzir a citotoxicidade num tecido RhCE, medido pelo ensaio do MTT (16) (ver ponto 21). A viabilidade do tecido RhCE na sequência da exposição a um produto químico em estudo é determinada em relação aos tecidos tratados com a substância de controlo negativa (taxa de viabilidade em %) e é utilizada para prever o potencial de perigosidade ocular do produto em causa.

7. Existem normas de desempenho (17) para facilitar a validação de ensaios *in vitro*, novos ou modificados, baseados no RhCE, semelhantes ao EIT EpiOcular™ e ao EIT HCE SkinEthic™, em conformidade com os princípios do documento de orientação n.º 34 da OCDE (18), e permitir a alteração oportuna da *Test Guideline* 492 da OCDE, para que possa abranger os referidos ensaios. A aceitação mútua de dados (MAD) nos termos do acordo da OCDE só poderá ser garantida para métodos de ensaio validados de acordo com as normas de desempenho, se tiverem sido revistos e incluídos na correspondente diretriz de ensaio da OCDE.

DEFINIÇÕES

8. O apêndice 1 contém definições.

▼**M8**

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES

9. O presente método de ensaio baseia-se em tecidos RhCE tridimensionais disponíveis no comércio que são produzidos utilizando queratinócitos primários de epiderme humana (OCL-200 da EpiOcular™) ou células epiteliais da córnea humana imortalizadas (HCE/S da SkinEthic ™). Os tecidos RhCE OCL-200 da EpiOcular™ e HCE/S da SkinEthic™ são similares à estrutura tridimensional do epitélio corneano *in vivo* e são produzidos utilizando células da espécie-alvo (19)(20). Além disso, os ensaios medem diretamente a citotoxicidade resultante da penetração do produto químico através da córnea e a produção de danos nas células e nos tecidos; a resposta citotóxica determina *in vivo* as lesões oculares graves/a irritação ocular totais resultantes. Os danos nas células podem ocorrer através de vários modos de ação (ver ponto 20), mas a citotoxicidade desempenha um papel mecanístico importante – se não essencial – na determinação da resposta global, em termos de lesões oculares graves/irritação ocular, a um produto químico, expressa *in vivo* principalmente por opacidade da córnea, irite, vermelhidão da conjuntiva e/ou equimose conjuntival, independentemente dos processos físico-químicos subjacentes aos danos dos tecidos.

10. Uma vasta gama de produtos químicos, que abrange uma grande diversidade de produtos químicos, classes químicas, pesos moleculares, log(P), estruturas químicas, etc., foi ensaiada no estudo de validação subjacente ao presente método de ensaio. A base de dados de validação do EIT EpiOcular™ contém um total de 113 produtos químicos, que abrangem 95 grupos funcionais orgânicos diferentes, de acordo com uma análise da caixa de ferramentas da QSAR Toolbax da OCDE (8). A maioria destes produtos químicos representa substâncias monocomponentes, mas várias substâncias multicomponentes (incluindo 3 homopolímeros, 5 copolímeros e 10 quase-polímeros) foram igualmente incluídas no estudo. No que respeita ao estado físico e às categorias do sistema GHS da ONU, os 113 produtos químicos objeto de ensaio foram distribuídos do seguinte modo: 13 líquidos da categoria 1, 15 sólidos da categoria 1, 6 líquidos da categoria 2A, 10 sólidos da categoria 2A, 7 líquidos da categoria 2B, 7 sólidos da categoria 2B, 27 líquidos de nenhuma categoria e 28 sólidos de nenhuma categoria (8). A base de dados do EIT HCE da SkinEthic™ contém um total de 200 produtos químicos, que abrangem 165 grupos funcionais orgânicos diferentes (8) (10) (11). A maioria destes produtos químicos representava substâncias monocomponentes, mas várias substâncias multicomponentes (incluindo 10 polímeros) foram igualmente incluídas no estudo. No que respeita ao estado físico e às categorias do sistema GHS da ONU, os 200 produtos químicos objeto de ensaio foram distribuídos do seguinte modo: 27 líquidos da categoria 1, 24 sólidos da categoria 1, 19 líquidos da categoria 2A, 10 sólidos da categoria 2A, 7 líquidos da categoria 2B, 8 sólidos da categoria 2B, 50 líquidos de nenhuma categoria e 53 sólidos de nenhuma categoria (10) (11).

11. O método é aplicável a substâncias e misturas, sólidos, líquidos, semissólidos e ceras. Os líquidos podem ser aquosos ou não e os sólidos podem ser solúveis ou insolúveis em água. Sempre que possível, os sólidos devem moídos em pó fino antes da aplicação; não é necessário nenhum outro tratamento prévio da amostra. O estudo de validação não incidiu em gases e aerossóis. Embora se admita que uns e outros possam ser ensaiados recorrendo à tecnologia RhCE, a versão atual do método não está vocacionada para ensaios de gases nem de aerossóis.

12. Os produtos químicos em estudo que absorvem a luz na gama do MTT formazano (naturalmente ou após tratamento) e os produtos químicos em estudo capazes de reduzir diretamente o corante vital MTT (a MTT formazano) podem interferir com as medições da viabilidade dos tecidos e requerer a realização de controlos adaptados para correção. O tipo de controlos adaptados que podem ser requeridos varia em função do tipo de interferência produzida pelo produto químico em estudo e do procedimento utilizado para quantificar o MTT formazano (ver pontos 36 a 42).

▼**M8**

13. Os resultados obtidos nos estudos de pré-validação (21) (22) e de validação (8) (10) (11) demonstraram que tanto o EIT EpiOcular™ como o EIT HCE SkinEthic™ são transferíveis para laboratórios considerados pouco experientes na realização dos ensaios e são igualmente reprodutíveis, quer no mesmo laboratório quer em laboratórios diferentes. Com base nestes estudos, o nível de reprodutibilidade das previsões expectáveis para o EIT da EpiOcular™ a partir de dados relativos a 113 produtos químicos é da ordem de 95 % a nível intralaboratorial e de 93 % a nível interlaboratorial. O nível de reprodutibilidade em termos de concordância das previsões expectáveis para o EIT HCE da SkinEthic™ a partir de dados relativos a 120 produtos químicos é da ordem dos 92 % a nível intralaboratorial e de 95 % a nível interlaboratorial.

14. O EIT da EpiOcular™ pode ser utilizado para identificar produtos químicos que não necessitem de ser classificados em termos de irritação ocular nem de lesões oculares graves de acordo com o sistema de classificação GHS da ONU e com o CRE. Tendo em conta os dados obtidos no estudo de validação (8), o EIT da EpiOcular™ tem uma exatidão global de 80 % (com base em 112 produtos químicos), uma sensibilidade de 96 % (57 produtos químicos) uma taxa de falsos negativos de 4 % (com base em 57 produtos químicos), uma especificidade de 63 % (55 produtos químicos) e uma taxa de falsos positivos de 37 % (55 produtos químicos) comparativamente com dados do ensaio ocular *in vivo* no coelho – método de ensaio B.5 (2)(14) classificado de acordo com o sistema de classificação GHS da ONU e com o CRE. Um estudo em que foram ensaiados com o EIT da EpiOcular™ 97 formulações de produtos agroquímicos líquidos demonstrou um desempenho do método de ensaio para este tipo de misturas similar ao obtido no estudo de validação (23). As 97 formulações distribuíram-se do seguinte modo: 21 da categoria 1, 19 da categoria 2A, 14 da categoria 2B e 43 sem categoria, classificadas de acordo com o sistema de classificação GHS da ONU com base em dados de referência do ensaio ocular *in vivo* do coelho (método de ensaio B.5) (2)(14). Foi obtida uma exatidão global de 82 % (com base em 97 formulações), uma sensibilidade de 91 % (54 formulações), uma taxa de falsos negativos de 9 % (54 formulações), uma especificidade de 72 % (43 formulações) e uma taxa de falsos positivos de 28 % (43 formulações) (23).

15. O IET HCE da SkinEthic™ pode ser utilizado para identificar produtos químicos que não necessitem de ser classificados em termos de irritação ocular nem de lesões oculares graves de acordo com o sistema de classificação GHS da ONU e com o CRE. Tendo em conta os dados obtidos no estudo de validação (10) (11), o EIT HCE da SkinEthic™ tem uma exatidão global de 84 % (com base em 200 produtos químicos), uma sensibilidade de 95 % (97 produtos químicos) uma taxa de falsos negativos de 5 % (97 produtos químicos), uma especificidade de 72 % (103 produtos químicos) e uma taxa de falsos positivos de 28 % (103 produtos químicos) comparativamente com dados do ensaio ocular *in vivo* no coelho (método de ensaio B.5 (2)(14) classificado de acordo com o sistema de classificação GHS da ONU e com o CRE.

16. As taxas de falsos negativos obtida com ambos os ensaios RhCE, tanto para as substâncias como para as misturas, estão dentro dos 12 % de probabilidade de os produtos químicos serem identificados como pertencendo à categoria 2 ou a nenhuma do GHS da ONU e do CRE pelo ensaio ocular de Draize *in vivo*, em testes repetidos; ou seja, são devidas à variabilidade intrínseca do método de ensaio (24). As taxas de falsos positivos obtidas com ambos os métodos de ensaio RhCE tanto com substâncias como com misturas não são críticas no contexto do presente método de ensaio, uma vez que todos os produtos químicos que produzem uma viabilidade dos tecidos igual ou inferior aos limites estabelecidos (ver ponto 44) requerem ensaios complementares por recurso a outros métodos de ensaio *in vitro,* ou, em

▼M8

último recurso, em coelhos, consoante os requisitos regulamentares, utilizando uma estratégia de ensaios sequenciais, numa abordagem de ponderação da suficiência da prova. Estes métodos podem ser usados para todos os tipos de produtos químicos, devendo um resultado negativo ser aceite para que não se classifique um produto químico em termos de irritação ocular e de lesões oculares graves (nenhuma categoria do GHS da ONU/CRE). Devem consultar-se as entidades reguladoras competentes antes da utilização do EIT da EpiOcular™ e do EIT HCE da SkinEthic™ quanto à aplicação de sistemas de classificação diferentes do GHS da ONU/CRE.

17. Uma limitação do presente método de ensaio reside no facto de não permitir distinguir irritação ocular/efeitos oculares reversíveis (categoria 2) e lesões oculares graves/efeitos oculares irreversíveis (categoria 1), definidos no sistema GHS da ONU e no CRE, nem entre irritantes oculares (categoria 2A facultativa) e irritantes oculares ligeiros (categoria 2B facultativa), definidos no sistema GHS da ONU (1). Para o efeito, são necessários ensaios complementares por recurso a outros métodos de ensaio *in vitro*.

18. A expressão «produto químico em estudo» é utilizada no presente método de ensaio refere-se ao objeto do estudo ([1]), não pressupondo a aplicabilidade do método de ensaio RhCE ao ensaio de substâncias e/ou misturas.

PRINCÍPIO DO ENSAIO

19. O produto químico em estudo é aplicado localmente a um mínimo de dois sistemas tridimensionais de tecido RhCE, sendo a viabilidade dos tecidos medida após a exposição e um período de incubação subsequente ao tratamento. Os tecidos RhCE são reconstruídos a partir de queratinócitos primários da epiderme humana ou de células epiteliais da córnea humana imortalizadas, cultivadas durante vários dias para formar um epitélio escamoso, estratificado, altamente diferenciado e morfologicamente semelhante ao encontrado na córnea humana. O tecido RhCE da EpiOcular™ consiste em, pelo menos, três camadas viáveis de células e uma superfície não queratinizada, apresentando uma estrutura análoga à estrutura *in vivo*. O tecido HCE RhCE da SkinEthic™ consiste em, pelo menos, quatro camadas viáveis de células, incluindo células colunares basais, células transicionais aladas e células escamosas superficiais similares às do epitélio da córnea humana normal. (20) (26).

20. As lesões oculares graves, ou irritação ocular grave, induzidas por produtos químicos, que se manifestam *in vivo*, principalmente, por opacidade da córnea, irite, vermelhidão da conjuntiva e/ou equimose conjuntival, resultam de uma sucessão de eventos que se inicia com a penetração do produto químico na córnea e/ou na conjuntiva e a produção de danos nas células. Estes podem ocorrer por vários modos de ação, nomeadamente lise da membrana celular (caso, por exemplo, dos tensioativos e solventes orgânicos), coagulação macromolecular (sobretudo proteínas) (por exemplo, tensioativos, solventes orgânicos, ácidos e compostos alcalinos), saponificação de lípidos (por exemplo, por compostos alcalinos), interações de alquilação ou outras interações covalentes com macromoléculas (por exemplo, por descolorantes, peróxidos e alquiladores) (15) (27) (28). No entanto, ficou demonstrado que a citotoxicidade desempenha um papel mecanístico importante, se não essencial, na determinação da resposta global a um produto químico, expressa em lesões oculares graves/irritação ocular, independentemente dos processos físico-químicos subjacentes aos danos nos tecidos (29) (30). Além disso, o potencial

([1]) Em junho de 2013, a reunião conjunta acordou que, sempre que possível, nas *Test Guidelines* da OCDE novas e atualizadas, a expressão «produto químico em estudo» deveria passar a ser utilizada de forma mais coerente, para descrever o objeto do estudo.

▼M8

de lesões oculares graves/irritação ocular de um produto químico é principalmente determinado pela gravidade da lesão inicial (31), relacionada com a extensão da morte celular (29) e com a intensidade das respostas e eventuais resultados posteriores (32). Assim, de um modo geral, os irritantes leves apenas afetam o epitélio superficial da córnea, os irritantes ligeiros e moderados afetam, principalmente, o epitélio e o estroma superficial e os irritantes fortes afetam o epitélio, o estroma profundo e, por vezes, o endotélio corneano (30) (33). A medição da viabilidade do tecido RhCE, após exposição tópica a um produto químico em estudo, para identificar produtos químicos que não necessitem de ser classificados em caso de lesões oculares graves/ /irritação ocular (nenhuma categoria no sistema GHS da ONU e no CRE) baseia-se no pressuposto de que todos os produtos químicos indutores de lesões oculares ou irritação ocular graves induzirão citotoxicidade no epitélio da córnea e/ou na conjuntiva.

21. A viabilidade dos tecidos RhCE é normalmente medida pela conversão enzimática do corante vital MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio, azul de tiazolilo, n.º CAS 298-93-1] pelas células viáveis do tecido num sal azul de MTT formazano, que é determinado quantitativamente depois de extraído dos tecidos (16). Os produtos químicos que não necessitam de classificação e rotulagem de acordo com o sistema GHS da ONU/CRE (nenhuma categoria) são identificados como aqueles relativamente aos quais a viabilidade dos tecidos não diminui aquém de um limiar definido (ou seja, viabilidade dos tecidos não diminui > 60 %, no caso do EITL da EpiOcular™ e do HCE EITL da SkinEthic™ ([1]), e > 50 %, no caso do HCE EITS da SkinEthic™ ([2])) (ver ponto 44).

DEMONSTRAÇÃO DE COMPETÊNCIA TÉCNICA

22. Antes de utilizarem de forma rotineira os ensaios RhCE para fins normativos, os laboratórios devem demonstrar a sua competência técnica através da previsão correta dos quinze produtos químicos para a demonstração de competência técnica que constam do quadro 1. Estes produtos químicos foram selecionados a partir dos produtos utilizados nos estudos de validação dos VRM (8) (10) (11). A seleção inclui, na medida do possível, produtos químicos que: (i) abrangem diferentes estados físicos; (ii) cobrem toda a gama de respostas *in vivo* expressas em lesões oculares graves/irritação ocular, com base em resultados de alta qualidade obtidos no ensaio ocular *in vivo* de referência no coelho (método de ensaio B.5) (2)(14), no sistema de classificação GHS da ONU (categorias 1, 2A, 2B ou nenhuma categoria) (1) e no sistema de classificação CRE (categorias 1, 2 ou nenhuma categoria); (iii) cobrem os vários fatores de classificação *in vivo* (24)(25); (iv) são representativos das classes de produtos químicos utilizadas no estudo de validação (8)(10)(11); (v) cobrem uma boa e ampla representação dos grupos funcionais orgânicos (8)(10)(11); (vi) possuem estruturas químicas bem definidas (8)(10)(11); (vii) são coloridos e/ou redutores diretos do MTT; (viii) produziram resultados reprodutíveis em métodos de ensaio RhCE durante as respetivas validações; (ix) foram corretamente preditos por métodos de ensaio RhCE durante os respetivos estudos de validação; (x) cobrem toda a gama de respostas *in vitro* baseadas em dados de alta qualidade relativos aos métodos de ensaio RhCE (viabilidade de 0 a 100 %); (xi) estão comercialmente disponíveis; e (xii) não têm custos de aquisição e/ou de eliminação proibitivos. Caso um produto químico constante da lista não esteja disponível ou não possa ser utilizado por outros motivos justificados, pode utilizar-se outro produto que satisfaça os critérios acima descritos, por exemplo, com base nos produtos químicos utilizados na validação do método de referência. Qualquer alteração deve, no entanto, ser justificada.

([1]) EITL: EIT para líquidos, no caso do HCE sa SkinEthic™
([2]) EITS: EIT para sólidos no caso do HCE da SkinEthic™

▼**M8**

Quadro 1

Lista de produtos químicos recomendados para demonstração de competência técnica

Denominação química	N.º CAS	Grupo funcional orgânico ([1])	Estado físico	VRM1 — (%) viabilidade ([2])	VRM2 — (%) viabilidade ([3])	Previsão do VRM	Redutor do MTT	Interf. de cor
Categoria *in vivo*1 ([4])								
Tioglicolato de metilo	2365-48-2	Éster de ácido carboxílico; tioálcool	L	10,9 ±6,4	5,5 ±7,4	Previsão impossível	Y (forte)	N
Acrilato de hidroexitilo	818-61-1	Acrilato; Álcool	L	7,5±4,7 ([5])	1,6 ±1,0	Previsão impossível	N	N
2,5-Dimetil-2,5-hexanodiol	110-03-2	Álcool	S	2,3 ±0,2	0,2 ±0,1	Previsão impossível	N	N
Oxalato de sódio	62-76-0	Ácido dicarboxílico	S	29,0 ±1,2	5,3 ±4,1	Previsão impossível	N	N
Categoria in vivo2A ([4])								
Di-D-gluconato de N,N″-bis(4-clorofenil)-3,12-diimino-2,4,11,13-tetradecano-diimidamida (20 %, aquoso) ([6])	18472-51-0	Halogeneto de heterocíclicos aromáticos; halogeneto de arilo; grupo di-hidroxilo; guanidina;	L	4,0 ±1,1	1,3 ±0,6	Previsão impossível	N	Y (fraco)
Benzoato de sódio	532-32-1	Arilo; ácido carboxílico	S	3,5 ±2,6	0,6 ±0,1	Previsão impossível	N	N
Categoria in vivo 2B ([4])								
Dietiltoluamida	134-62-3	Benzamida	L	15,6 ±6,3	2,8 ±0,9	Previsão impossível	N	N
2,2-Dimetil-3-metilenobiciclo [2.2.1]heptano	79-92-5	Alcano ramificado com carbono terciário; alceno; biciclo-heptano; carbociclo de anel em ponte; carbociclo cicloalcano	S	4,7 ±1,5	15,8 ±1,1	Previsão impossível	N	N
Nenhuma categoria *in vivo* ([4])								
Etilsulfato de 1--etil-3-metilimidazólio	342573-75-5	Alcóxido; sal de amónio; arilo; imidazolo; sulfato	L	79,9 ±6,4	79,4 ±6,2	Nenhuma cat.	N	N

▼**M8**

Denominação química	N.º CAS	Grupo funcional orgânico ([1])	Estado físico	VRM1 — (%) viabilidade ([2])	VRM2 — (%) viabilidade ([3])	Previsão do VRM	Redutor do MTT	Interf. de cor
Éter dicaprílico	629-82-3	Alcóxido;éter	L	97,8 ±4,3	95,2 ±3,0	Nenhuma cat.	N	N
Butóxido de piperonilo	51-03-6	Alcoxi; benzodioxole; benzilo; éter	L	104,2 ±4,2	96,5 ±3,5	Nenhuma cat.	N	N
Polietilenoglicol (PEG-40) com óleo de rícino hidrogenado	61788-85-0	Acila; álcool; alilo; éter	Viscosidade	77,6 ±5,4	89,1 ±2,9	Nenhuma cat.	N	N
1-(4-Clorofenil)-3--(3,4-diclorofenil)ureia	101-20-2	Heterocíclicos aromáticos; halogeneto de arilo; derivados de ureia	S	106,7 ±5,3	101,9 ±6,6	Nenhuma cat.	N	N
2,2′-Metileno-bis[6--(2H-benzotriazol-2--il)-4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenol]	103597-45-1	Alcano ramificado com carbono quaternário; carbocíclicos fundidos aromáticos; heterocíclicos fundidos saturados; compostos quinóides precursores; *terc*-butilo	S	102,7 ±13,4	97,7 ±5,6	Nenhuma cat.	N	N
Tetrafluoroborato de potássio	14075-53-7	Sal inorgânico	S	88,6 ±3,3	92,9 ±5,1	Nenhuma cat.	N	N

Abreviaturas:

N.º CAS = Número de registo do Chemical Abstracts Service; GHS da ONU = Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos das Nações Unidas (em inglês: Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals – UN GHS); (1); VRM1 = Método de referência validado, IET da EpiOcular™; VRM2 = Método de referência validado, HCE IET da SkinEthic™; Interf. de cor = interferência de cor com a medição da absorvância padrão (densidade ótica – DO) do MTT formazano.

([1]) Grupo funcional orgânico atribuído de acordo com a análise 3.3 da Toolbox da OCDE (8).

([2]) Com base nos resultados obtidos com o EIT da EpiOcular™ no ensaio de validação de irritação ocular (EIVS) do EURL ECVAM/Cosmetics Europe (8).

([3]) Com base nos resultados obtidos com o HCE EIT SkinEthic™ no estudo de validação (10) (11).

([4]) Com base nos resultados do ensaio ocular *in vivo* no coelho (método de ensaio B.5/TG 405 da OCDE) (2) (14) e utilizando o sistema GHS da ONU.

([5]) Com base nos resultados obtidos no âmbito do CEFIC CONsortium for *in vitro* Eye Irritation testing strategy (CON4EI) Study.

([6]) A classificação na categoria 2A ou 2B depende da interpretação do critério do sistema GHS da ONU para distinguir estas categorias: se para a classificação na categoria 2A poder ser atribuída é necessário que 1 em 3 ou 2 em 3 animais exibam efeitos no sétimo dia. O estudo *in vivo* incidiu em 3 animais. Todos os animais recuperaram para a pontuação 0 ao sétimo dia, ou antes, em todos os parâmetros, exceto a opacidade da córnea num animal. No sétimo dia, este animal apresentava opacidade da córnea com pontuação 1; no nono dia, estava totalmente recuperado.

23. No âmbito do ensaio de competência técnica, recomenda-se que o utilizador verifique, após a receção dos tecidos, as propriedades de barreira dos mesmos, especificadas pelo produtor do modelo de tecido RhCE. Este aspeto é especialmente importante se os tecidos forem expedidos a longas distâncias ou demorarem muito tempo a chegar. A partir do momento em que um método de ensaio esteja implantado e tenha sido adquirida e demonstrada competência técnica para o utilizar, não é necessário efetuar por rotina a referida verificação. Recomenda-se, contudo, que, ao utilizar com regularidade um método de ensaio, se continue a avaliar periodicamente as propriedades de barreira.

▼M8

PROCEDIMENTO

24. Os ensaios atualmente abrangidos por este método de ensaio são os cientificamente válidos EIT da EpiOcular™ e HCE EIT da SkinEthic™ (9) (12) (13), referidos como métodos de referência validados (VRM1 e VRM2, respetivamente). Existem procedimentos operacionais normalizados (PON) para os métodos de ensaio RhCE, que devem ser utilizados nas fases de implementação e utilização dos métodos de ensaio no laboratório (34) (35). Os pontos seguintes e o apêndice 2 descrevem os principais componentes e procedimentos dos ensaios RhCE.

COMPONENTES DO MÉTODO DE ENSAIO RHCE

Condições gerais

25. Devem utilizar-se células de origem humana adequadas para reconstruir o tecido tridimensional do epitélio corneano, composto por células progressivamente estratificadas, mas não cornificadas. O modelo do tecido RhCE é preparado em inserções com uma membrana sintética porosa, através da qual os nutrientes podem passar para as células. Devem estar presentes no epitélio corneano reconstruído várias camadas de células epiteliais viáveis, não queratinizadas. O modelo de tecido RhCE deve ter a superfície epitelial em contato direto com o ar, de modo a permitir a exposição tópica direta aos produtos químicos em estudo numa forma semelhante àquela como o epitélio corneano seria exposto *in vivo*. O modelo de tecido RhCE deve formar uma barreira funcional com robustez suficiente para resistir a uma penetração rápida de substâncias de referência citotóxicas, por exemplo, o Triton X-100 ou SDS. Importa demonstrar a eficácia da barreira, que pode ser avaliada pela determinação do tempo de exposição necessário para reduzir a viabilidade tecidual em 50 % (ET_{50}), por aplicação de uma substância de referência a uma concentração específica fixa – p.ex., 100 µl de Triton X-100 a 0,3 % (v/v) – ou à concentração na qual a substância de referência reduz a viabilidade dos tecidos em 50 % (IC_{50}) após um tempo de exposição determinado (p.ex., 30 minutos de exposição com 50 µl de SDS) – ver ponto 30. As propriedades de contenção do tecido RhCE reconstruído devem impedir a passagem do produto químico em estudo na extremidade do tecido viável, o que redundaria numa modelação deficiente da exposição da córnea. As células de origem humana utilizadas para reconstruir o tecido RhCE devem estar isentas de contaminação por bactérias, vírus, micoplasmas e fungos. A esterilidade do tecido deve ser verificada pelo fornecedor, para assegurar que não está contaminado por fungos e bactérias.

Condições funcionais

Viabilidade

26. O ensaio utilizado para quantificar a viabilidade dos tecidos é o ensaio MTT (16). As células viáveis do tecido RhCE reconstruído reduzem o corante vital MTT a um precipitado azul de MTT formazano, que é depois extraído do tecido com isopropanol (ou solvente similar). O MTT formazano extraído pode ser quantificado por um método normalizado de medição da absorvância (densidade ótica – DO) ou um procedimento de espetrofotometria HPLC/ /UPLC (36). A densidade ótica do solvente de extração isolado deve ser suficientemente baixa (< 0,1). Os utilizadores do tecido RhCE reconstruído devem garantir que cada lote utilizado preenche os critérios definidos para o controlo negativo. Os intervalos de aceitabilidade para os valores de densidade ótica dos controlos negativos para o VRMS são indicados no quadro 2. Os utilizadores de espetrofotometria HPLC/UPLC devem utilizar as gamas de controlo negativo da densidade ótica indicadas no quadro 2 como critério de aceitação para o controlo negativo. O relatório do ensaio deve documentar a estabilidade em cultura dos tecidos tratados com a substância de controlo negativo (fornecer medições da viabilidade de tecidos similares) no período de exposição do ensaio. O procedimento deve ser idêntico ao seguido pelo produtor de tecidos no âmbito do controlo de qualidade da liberação dos lotes de tecido; neste caso, podem ser aplicáveis critérios de aceitação diferentes dos especificados no quadro 2. O fabricante de tecidos RHCE deve

▼M8

estabelecer um intervalo de aceitabilidade (limite superior e inferior) para os valores de densidade ótica dos controlos negativos (nas condições do método de ensaio do controlo da qualidade) do concetor/fornecedor.

Quadro 2

Intervalos de aceitabilidade dos valores de densidade ótica dos controlos negativos (para os utilizadores do ensaio)

Ensaio	Limite inferior de aceitabilidade	Limite superior de aceitabilidade
EIT da EpiOcular™ (OCL-200) – VRM1 (para protocolos de líquidos e sólidos)	> 0,8 ([1])	< 2,5
HCE EIT (HCE/S) da SkinEthic™ – VRM2 (para protocolos de líquidos e sólidos)	> 1,0	≤ 2,5

([1]) Este limite de aceitação considera a possibilidade de períodos transporte/armazenamento prolongados (por ex., > 4 dias), que se demonstrou não ter impacto no desempenho do método de ensaio (37).

Função de barreira

27. O tecido RhCE deve ser suficientemente espesso e robusto para resistir à rápida penetração de substâncias de referência citotóxicas, estimada, por exemplo, pelo EF_{50} (Triton X-100) ou pela IC_{50} (SDS) (quadro 3). A função de barreira de cada lote do tecido RhCE utilizado deve ser demonstrada pelo concetor/fornecedor do RhCE, aquando do fornecimento dos tecidos ao utilizador final (ver ponto 30).

Morfologia

28. O exame histológico do tecido RhCE deve mostrar uma estrutura de epitélio corneano humano (incluindo pelo menos 3 camadas de células epiteliais viáveis e uma superfície não queratinizada). Para os VRM, a morfologia adequada foi estabelecida pelo criador/fornecedor, pelo que não precisa de ser novamente demonstrada por um utilizador do método de ensaio para cada lote de tecidos utilizado.

Reprodutibilidade

29. Os resultados dos controlos positivos e negativos do método de ensaio devem mostrar reprodutibilidade ao longo do tempo.

Controlo de qualidade

30. O tecido RhCE só deve ser utilizado se o concetor/fornecedor demonstrar que cada lote obedece a critérios definidos de liberação da produção, dos quais o de viabilidade (ponto 26) e o de função de barreira (ver ponto 27) são os mais relevantes. O concetor/fornecedor do tecido RhCE deve estabelecer uma gama de aceitabilidade (limites superior e inferior) para as funções de barreira, medidas por ET_{50} ou IC_{50} (ver pontos 25 e 26). A gama de aceitabilidade do ET_{50} e IC_{50}, utilizada como critério de controlo da qualidade para a liberação dos lotes de RhCE pelo seu concetor/fornecedor (utilizado nos VRM), figura no quadro 3. O concetor/fornecedor do tecido RhCE deve fornecer aos utilizadores do método de ensaio dados que demonstrem o cumprimento de todos os critérios de liberação da produção, para que os utilizadores possam incluir essas informações no relatório de ensaio. Apenas os resultados obtidos com tecidos que satisfaçam todos os critérios de liberação da produção podem ser aceites para a previsão fiável de produtos químicos que, em conformidade com o GHS da ONU/CRE, não necessitem de classificação e rotulagem em termos de irritação ocular ou de lesões oculares graves.

▼M8

Quadro 3

Critério de QC para a liberação de lotes

Ensaio	Limite inferior de aceitabilidade	Limite superior de aceitabilidade
EIT da EpiOcular™ (OCL-200) – VRM1 [100 µl de Triton X-100 a 0,3 % (v/v)]	ET_{50} = 12,2 min	ET_{50} = 37,5 min
HCE IET (HCE/S) da SkinEthic™ – VRM2 (tratamento de 30 minutos, com 50 µl de SDS)	IC_{50} = 1 mg/ml	IC_{50} = 3,2 mg/ml

Aplicação dos produtos químicos em estudo e das substâncias de controlo

31. Em cada ensaio de cada série, devem utilizar-se, pelo menos, dois replicados de tecido para cada produto químico em estudo e para cada substância de controlo. Utilizam-se dois protocolos de tratamento diferentes, um para produtos químicos em estudo no estado líquido e outro para produtos químicos no estado sólido (34) (35). Para ambos os métodos e protocolos, a superfície do modelo de tecido deve ser humedecida com solução salina tamponada de fosfatos de Dulbecco, sem cálcio e sem magnésio (DPBS sem Ca^{2+}/Mg^{2+}), antes da aplicação dos produtos químicos em estudo, para simular as condições de humidade do olho humano. O tratamento dos tecidos é iniciado com a exposição ao(s) produto(s) químico(s) em estudo e às substâncias de controlo. Para ambos os protocolos de tratamento de ambos os VRM, aplica-se uma quantidade suficiente do produto químico em estudo ou da substância de controlo para cobrir uniformemente a superfície epitelial, evitando-se uma dose infinita (ver pontos 32 e 33) (apêndice 2).

32. Os produtos químicos em estudo que possam ser pipetados a 37 °C ou a temperaturas inferiores – utilizando uma pipeta de deslocamento positivo, se necessário – são tratados como líquidos nos VRM; caso contrário, devem ser tratados como sólidos (ver ponto 33). Nos VRM, o produto químico líquido em estudo está uniformemente espalhado pela superfície do tecido – ou seja, um mínimo de 60 µl/cm de aplicação; ver apêndice 2, (33) (34). Devem evitar-se, na medida do possível, efeitos capilares (efeitos de tensão superficial) que possam ocorrer devido aos baixos volumes aplicados na inserção (na superfície do tecido), para garantir a dosagem correta do tecido. Os tecidos tratados com produtos químicos líquidos em estudo são incubados durante 30 minutos em condições de cultura normais (37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥ 95 % HR). No final do período de exposição, devem remover-se cuidadosamente da superfície do tecido o produto químico líquido em estudo e as substâncias de controlo, através de uma lavagem extensiva com DPBS sem Ca^{2+}/Mg^{2+}, à temperatura ambiente. Esta fase de lavagem é seguida por uma imersão pós-exposição em meio fresco à temperatura ambiente – para retirar o produto químico em estudo absorvido pelo tecido – por um período predefinido, que varia em função do VRM utilizado. Unicamente para o VRM1, antes da realização do ensaio com MTT, é praticada uma incubação pós-exposição em meio fresco, em condições de cultura normais – ver apêndice 2, (34) (35).

33. Os produtos químicos em estudo que não possam ser pipetados a temperaturas até 37 °C são tratados como sólidos no VRM. A quantidade de produto aplicada deve ser suficiente para cobrir toda a superfície do tecido, ou seja, deve utilizar-se um mínimo de 60 mg/cm^2 (apêndice 2). Sempre que possível, os sólidos devem ser ensaiados na forma de pó fino. Os tecidos tratados com produtos químicos sólidos são incubados por um período predefinido,

▼M8

consoante o VRM utilizado, em condições de cultura normais – ver apêndice 2, (34) (35). No final do período de exposição, devem remover-se cuidadosamente da superfície do tecido o produto químico em estudo e as substâncias de controlo, através de uma lavagem extensiva com DPBS sem Ca^{2+}/Mg^{2+}, à temperatura ambiente. Esta fase de lavagem é seguida de uma imersão pós-exposição em meio fresco, à temperatura ambiente – para remoção do produto químico em estudo absorvido pelo tecido –, por um período predefinido que varia em função do VRM utilizado, e de uma incubação após exposição em meio fresco em condições de cultura normais, antes da realização do ensaio com MTT – ver apêndice 2, (34) (35).

34. Devem prever-se controlos negativos e positivos paralelos, para demonstrar que a viabilidade (determinada com o controlo negativo) e a sensibilidade (determinada com o controlo positivo) dos tecidos se encontram dentro dos intervalos de aceitação definidos com base em dados históricos. O controlo negativo paralelo proporciona ainda a linha de base (100 % de viabilidade dos tecidos) para calcular a percentagem de viabilidade relativa dos tecidos tratados com o produto químico em estudo (ensaio de % de viabilidade). A substância de controlo positivo recomendada para o VRM é o acetato de metilo puro (n.º CAS 79-20-9, comercializado, por exemplo, pela Sigma-Aldrich, Cat n.º 45997; líquido). As substâncias de controlo negativo recomendadas para os VRM1 e VRM2 são água ultrapura e DPBS sem Ca^{2+}/Mg^{2+}, respetivamente. Foram estas as substâncias de controlo utilizadas nos estudos de validação dos VRM e aquelas para as quais existem mais dados. A utilização de outras substâncias de controlo, positivas ou negativas, adequadas deverá justificar-se científica e adequadamente. Os controlos negativos e positivos devem ser ensaiados com o(s) protocolo(s) utilizado(s) para os produtos químicos em estudo incluídos na série de ensaios (líquidos e/ou sólidos). A aplicação deve ser seguida da exposição ao produto químico em estudo, da lavagem, da imersão pós-exposição e da incubação pós-exposição, quando pertinente, conforme descrito para os controlos paralelos aos ensaios dos produtos químicos líquidos (ver ponto 32) ou para os controlos paralelos aos ensaios dos produtos químicos sólidos (ver ponto 33), antes da realização do ensaio com MTT (ver ponto 35) (34) (35). Um único conjunto de controlos negativos e positivos é suficiente para todos os produtos químicos no mesmo estado físico (líquidos ou sólidos) incluídos na mesma série de ensaios.

Medições de viabilidade dos tecidos

35. Para medir a viabilidade celular no âmbito do presente método, deve utilizar-se o método quantitativo validado do MTT, que é compatível com a arquitetura tridimensional dos tecidos. O ensaio do MTT é efetuado imediatamente após o período de incubação pós-exposição. Nos VRM, a amostra de tecido RhCE é colocada em 0,3 ml de solução de MTT a 1 mg/ml durante 180±15 minutos, em condições de cultura normais. O corante vital MTT é reduzido a um precipitado azul de MTT formazano pelas células viáveis do tecido RhCE. O precipitado é em seguida extraído do tecido com recurso a um volume adequado de isopropanol, ou a um solvente similar (34) (35). No caso dos tecidos ensaiados com produtos químicos líquidos em estudo, a extração deve ser feita da parte superior e inferior, enquanto no caso dos tecidos ensaiados com produtos químicos sólidos e líquidos coloridos, a extração devem ser efetuada unicamente da parte inferior, para minimizar uma eventual contaminação da solução de extração de isopropanol com produto químico em estudo que possa ter permanecido no tecido. No caso dos tecidos que tenham sido ensaiados com produtos químicos líquidos e que não tenham sido imediatamente lavados, a extração também deve ser feita apenas da parte inferior. As substâncias de controlo positivo e positivo paralelo devem ser tratadas de forma similar à do produto químico em estudo. O MTT formazano extraído pode ser quantificado quer por medição da absorvância-padrão (DO) a 570 nm, utilizando um filtro de banda passante de ±30 nm, no máximo, quer por um procedimento de espetrofotometria HPLC/UPLC –ver ponto 42 (11) (36).

▼**M8**

36. As propriedades óticas do produto químico em estudo ou a sua ação química sobre o MTT podem interferir na medição do MTT formazano, conduzindo a uma estimativa falsa da viabilidade dos tecidos. Os produtos químicos em estudo podem interferir com a medição do MTT formazano por redução direta do MTT a azul de MTT formazano e/ou por interferência cromática, se a sua absorvância, quer natural, quer devida a procedimentos de tratamento, se situar na mesma gama de densidade ótica que o MTT formazano (cerca de 570 nm). Devem realizar-se controlos prévios para permitir a identificação de potenciais redutores diretos do MTT e/ou de produtos químicos com interferência cromática; devem ainda efetuar-se controlos adicionais para detetar e corrigir possíveis interferências desses produtos químicos em estudo (ver os pontos 37 a 41). Este aspeto é especialmente importante quando um produto químico em estudo não é completamente removido do tecido RhCE por lavagem ou quando penetra no epitélio corneano propriamente dito e está, portanto, presente no tecido RhCE quando é realizado o ensaio do MTT. No caso dos produtos químicos que absorvem a luz na mesma gama do MTT formazano (naturalmente ou após tratamento) e que não são compatíveis com a medição da absorvância-padrão (DO) do MTT formazano devido a uma interferência demasiado forte – ou seja, uma forte absorvância a 570 ±30 nm –, pode recorrer-se a um procedimento de espetrofotometria-HPLC/UPLC para medir o MTT formazano (ver pontos 41 e 42) (11) (36). Nos PON dos VRM está disponível uma descrição pormenorizada do modo de deteção e correção da redução direta do MTT e das interferências dos agentes corantes (34) (35). Os apêndices III e IV contêm fluxogramas com orientações sobre o modo de identificar e manusear os redutores diretos do MTT e/ou os produtos químicos suscetíveis de interferirem cromaticamente no VRM1 e VRM2, respetivamente.

37. Para identificar eventuais interferências provocadas por produtos químicos em estudo com a mesma gama de absorvância da luz que o MTT (naturalmente ou após tratamento) e determinar a necessidade de proceder a controlos adicionais, o produto químico em estudo é adicionado a água e/ou isopropanol e incubado, por um período adequado, à temperatura ambiente – ver apêndice 2, (34) (35). Se o produto químico em estudo, dissolvido em água e/ou em isopropanol, mostrar uma absorvância suficiente na gama de 570 ±20 nm para o VRM1 (ver apêndice 3), ou caso se obtenha uma solução colorida quando se mistura o produto com água, para o VRM2 (ver apêndice 4), presume-se que o produto químico em causa interfere com a medição da absorvância-padrão do MTT formazano, devendo realizar-se controlos de corante complementares ou, em alternativa, utilizar um procedimento de espetrofotometria HPLC/UPLC, caso em que estes controlos não são exigidos (ver pontos 41 e 42 e apêndices III e IV) (34) (35). Ao efetuar a medição da absorvância-padrão, deve-se aplicar cada um dos produtos químicos em estudo interferentes em, pelo menos, dois replicados viáveis do tecido, que são submetidos à totalidade do processo de ensaio, mas são incubados em meio e não na solução de MTT durante a fase de incubação com MTT, de modo a produzir uma cor não específica no controlo dos tecidos vivos (NSC_{vivos}) (34) (35). O controlo NSC_{vivos} tem de ser realizado em paralelo ao ensaio do produto químico corado em estudo; no caso de ensaios múltiplos, é necessário efetuar, em cada série de ensaios, um NSC_{vivos} independente para cada ensaio, devido à variabilidade biológica intrínseca dos tecidos vivos. A viabilidade real do tecido é calculada como a percentagem de viabilidade dos tecidos obtida com tecidos vivos expostos ao produto químico em estudo interferente e incubados com a solução de MTT (ensaio de % de viabilidade) menos a percentagem de cor não específica obtida com tecidos vivos expostos ao produto químico em estudo interferente e incubados em meio sem MTT paralelamente à correção do ensaio (% NSC_{vivos}), ou seja: viabilidade real do tecido = [ensaio de % de viabilidade] - [% NSC_{vivos}].

38. Para identificar os redutores diretos do MTT, os produtos químicos de ensaio devem ser adicionados a soluções de MTT recentemente preparadas. Adiciona-se uma quantidade adequada do produto químico em estudo a

▼M8

uma solução de MTT, sendo a mistura incubada durante cerca de 3 horas em condições de cultura normais (ver apêndices III e IV) (34) (35). Se a mistura de MTT que contém o produto químico em estudo (ou a suspensão, no caso de produtos químicos insolúveis) se tornar azul/púrpura, considera-se que o produto reduz diretamente o MTT, devendo proceder-se a um controlo funcional complementar nos tecidos RhCE não viáveis, independentemente de se recorrer à medição da absorvância padrão ou a um procedimento de espetrofotometria HPLC/UPLC. Este controlo funcional complementar utiliza tecidos mortos, que apenas possuem atividade metabólica residual, mas absorvem e retêm o produto químico em estudo de forma semelhante aos tecidos viáveis. Os tecidos do VRM1 mortos «por congelamento» são preparados por exposição a baixas temperaturas. Os tecidos do VRM2 mortos «em água» são preparados por incubação prolongada (pelo menos, 24 ±1 h) em água, seguida de armazenagem a baixa temperatura. Cada produto químico em estudo redutor do MTT é aplicado em, pelo menos, dois tecidos replicados mortos, que são submetidos a todo o processo de ensaio a fim de gerarem um controlo não específico da redução do MTT (NSMTT) (32) (33) (34) (35). Basta um único controlo do NSMTT para cada produto químico em estudo, independentemente do número de ensaios ou de ensaios/séries de ensaios realizados. A viabilidade real do tecido é calculada como a percentagem de viabilidade do tecido obtida com os tecidos vivos expostos ao redutor do MTT (ensaio de % de viabilidade), menos a percentagem de redução não específica do MTT obtida com os tecidos mortos expostos ao mesmo redutor do MTT, calculada em relação ao controlo negativo concomitante ao ensaio a corrigir, ou seja: viabilidade real do tecido = [ensaio de % de viabilidade] - [(% NSMTT].

39. Os produtos químicos em estudo identificados como produzindo tanto interferências cromáticas (ver ponto 37) como uma redução direta do MTT (ver ponto 38) deverão também ser objeto de um terceiro conjunto de controlos no âmbito da medição da absorvância-padrão (DO), para além dos controlos de NSMTT e NSC_{vivos} a que se referem os números anteriores. Trata-se, em geral, de produtos químicos de cor escura que absorvem luz na gama 570 ±30 nm (por exemplo, azuis, púrpura, pretos), porque a sua cor intrínseca impede a avaliação da capacidade de reduzirem diretamente o MTT, conforme descrito no ponto 38. Esta situação força o recurso, por defeito, a controlos de NSMTT em conjunto com os controlos NSC_{vivos}. Os produtos químicos em estudo para os quais se realizem ambos os controlos NSMTT e NSC_{vivos} podem ser absorvidos e retidos por tecidos vivos e mortos. Por conseguinte, neste caso, o controlo NSMTT permite não só corrigir uma potencial redução direta do MTT pelo produto químico em estudo, como também evitar as interferências cromáticas resultantes da absorção e da retenção do produto pelos tecidos mortos. Pode, assim observar-se a uma dupla correção das interferências cromáticas, uma vez que o controlo NCS_{vivos} corrige já as interferências que resultam da absorção e retenção do produto químico em estudo pelos tecidos vivos. Para evitar uma eventual dupla correção da interferência cromática, importa realizar um terceiro controlo cromático não específico nos tecidos mortos (NSC_{mortos}) – ver apêndices III e IV (34) (35). Neste controlo adicional, aplica-se o produto químico em estudo em, pelo menos, dois replicados dos tecidos mortos, que são submetidos à totalidade do procedimento de ensaio mas são incubados com meio durante a etapa de incubação com MTT, em vez da solução de MTT. Basta um único controlo NSC_{mortos} por produto químico em estudo, independentemente do número de ensaios ou séries de ensaios, mas deve ser realizado concomitantemente com o controlo NSMTT e com o mesmo lote de tecidos. A viabilidade real do tecido é calculada como a percentagem de viabilidade dos tecidos obtida com tecidos vivos expostos ao produto químico (ensaio de % de viabilidade) menos %NSMTT menos % NSC_{vivos} mais a percentagem de cor não específica obtida com tecidos mortos expostos ao produto químico em estudo interferente e incubados em meio sem MTT, calculada em relação à amostra do controlo negativo realizado em simultâneo com o ensaio a corrigir (% NSC_{mortos}), ou seja: viabilidade real do tecido = [ensaio de % de viabilidade] - [%NSMTT] - [%NSC_{vivos}] + [%NSC_{mortos}].

▼M8

40. É importante assinalar que a redução não específica do MTT e as interferências cromáticas não específicas podem aumentar a densidade ótica (nas medições da absorvância-padrão) do extrato de tecido acima da gama de linearidade do espetrofotómetro e que, na medição por espetrofotometria HPLC/UPLC, a redução não específica do MTT pode também aumentar a área do pico de formazano do extrato de tecido acima da gama de linearidade do espetrofotómetro. Neste contexto, cada laboratório deve determinar a densidade ótica/área de pico da gama de linearidade do respetivo espetrofotómetro, por exemplo, com MTT formazano (n.º CAS 57360-69-7), comercializado, por exemplo, pela Sigma-Aldrich (n.º Cat M2003), antes de iniciar o ensaio de produtos químicos em estudo para fins normativos.

41. A medição da absorvância-padrão (DO) com espetrofotómetro é adequada para avaliar produtos químicos em estudo redutores diretos do MTT e com interferência cromática, se a interferência observada com a medição do MTT formazano não for muito forte (ou seja, se as DO dos extratos de tecidos obtidos com o produto químico em estudo, sem qualquer correção para a redução direta do MTT e/ou para a interferência cromática, se situarem na gama linear do espetrofotómetro). No entanto, os resultados para produtos químicos em estudo que produzam % NSMTT e/ou % NSC_{vivos} iguais ou superiores a 60 % (VRM1 e protocolo de líquidos do VRM2) ou 50 % (protocolo de sólidos do VRM2) do controlo negativo devem ser interpretados com precaução, dado tratar-se do valor-limite estabelecido no VRMS para distinguir os produtos químicos classificados dos não classificados (ver ponto 44). Contudo, não é possível medir a absorvância-padrão (DO) se a interferência com a medição de MTT formazano for muito intensa (ou seja, de forma a que as DO não corrigidas dos extratos de tecidos se situem fora do intervalo linear do espectrofotómetro). Os produtos químicos em estudo corados ou que adquiram coloração em contacto com a água ou com o isopropanol e que interfiram muito fortemente com a medição da absorvância-padrão (DO) do MTT formazano podem também ser avaliados por recurso à espetrofotometria HPLC/UPLC (ver apêndices III e IV), pelo facto de o sistema HPLC/UPLC permitir a separação do MTT formazano do produto químico antes da sua quantificação (36). Por este motivo, nunca são necessários controlos NCS_{vivos} ou NCS_{mortos} quando se utiliza este método, independentemente do produto químico em estudo. Contudo, devem realizar-se controlos NSMTT se se suspeitar que o produto em causa reduz diretamente o MTT (cf. procedimento descrito no ponto 38). Devem também realizar-se estes controlos no caso de produtos químicos com uma coloração (intrínseca ou aparente quando dissolvidos em água) que impeça a avaliação da sua capacidade de reduzirem diretamente o MTT, conforme descrito no ponto 38. Caso se recorra à espetrofotometria HPLC/UPLC para medir o MTT formazano, a percentagem de viabilidade do tecido é calculada como a percentagem de todos os picos do MTT formazano obtidos com tecidos vivos expostos ao produto químico em estudo em relação a um pico obtido em paralelo com o controlo negativo. No caso de produtos químicos suscetíveis de reduzirem diretamente o MTT, a viabilidade real dos tecidos é calculada do seguinte modo: ensaio da % de viabilidade menos % NSMTT, tal como descrito no último período do ponto 38. Por último, importa referir que os redutores diretos do MTT, nomeadamente os que são também interferentes cromáticos e que são retidos nos tecidos após o tratamento e reduzem tão fortemente o MTT que produzem DO (pelo método de medição da densidade ótica padrão) ou áreas de picos (por espetrofotometria UPLC/ /HPLC) não abrangidas pela gama de linearidade do espetrofotómetro, não permitem que os extratos de tecidos sejam avaliados pelos métodos do ensaio RhCE, embora se preveja que tal ocorra apenas em casos muito raros.

42. A espetrofotometria HPLC/UPLC pode ser utilizada para a medição do MTT formazano com todos os tipos de produtos químicos em estudo (corados ou não, redutores de MTT ou não) (36). Atendendo à diversidade dos sistemas de espetrofotometria HPLC/UPLC, não é exequível que cada utilizador adote

▼M8

exatamente as mesmas condições sistémicas. Pelo mesmo motivo, a qualificação dos sistemas de espetrofotometria HPLC/UPLC deve ser demonstrada antes de serem utilizados para quantificar o MTT formazano de extratos de tecidos, através do cumprimento dos critérios de aceitação de um conjunto de parâmetros de qualificação normalizados conformes com os descritos na *U.S. Food and Drug Administration guidance for industry on bio-analytical method validation*. Estes parâmetros-chave e os respetivos critérios de aceitação constam do apêndice 5. Se os critérios de aceitação definidos no apêndice 5 forem cumpridos, considera-se o sistema de espetrofotometria HPLC/UPLC qualificado para determinar o MTT formazano nas condições experimentais descritas no presente método de ensaio.

Critérios de aceitação

43. Para cada série de ensaios que utilize lotes de tecidos RhCE conformes com o controlo de qualidade (ver ponto 30), os tecidos tratados com a substância de controlo negativa devem apresentar uma densidade ótica que reflita a qualidade dos tecidos subsequente à expedição, à receção e a todos os processos do protocolo, não devendo situar-se fora dos limites históricos descritos no quadro 2 (ver ponto 26). Da mesma forma, os tecidos tratados com a substância de controlo positivo (acetato de metilo) devem apresentar uma viabilidade tecidual média < 50 %, em relação ao controlo negativo no VRM1, no caso dos protocolos para líquidos ou sólidos, e ≤ 30 % (protocolo para líquidos) ou ≤ 20 % (protocolo para sólidos), em relação ao controlo negativo do VRM2, refletindo a sua capacidade de reação a um produto químico irritante, nas condições do método de ensaio (34)(35). A variabilidade entre os tecidos replicados dos produtos químicos em estudo e/ou dos produtos químicos de controlo deve situar-se dentro dos limites aceites (a diferença de viabilidade entre os dois tecidos replicados não deve exceder 20 % ou o desvio-padrão entre os três tecidos replicados não deve ser superior a 18 %). Se o controlo negativo ou positivo de uma série de ensaios se situar fora das gamas aceites, considera-se a série «não qualificada», pelo que deve ser repetida. Se a variabilidade entre os tecidos replicados do produto químico em estudo se situar fora da gama aceite, o ensaio é considerado «não qualificado», devendo o produto químico em estudo ser submetido a novo ensaio.

Interpretação dos resultados e modelo de previsão

44. Os valores da densidade ótica/das áreas dos picos obtidos com extratos de tecidos replicados, para cada produto químico em estudo, são utilizados para calcular a percentagem média de viabilidade dos tecidos (média entre os replicados dos tecidos) normalizada para o controlo negativo, fixada em 100 %. O valor-limite da percentagem de viabilidade dos tecidos para identificar produtos químicos em estudo que não necessitem de ser classificados em termos de irritação ocular nem de lesões oculares graves (nenhuma categoria no sistema GHS da ONU e na categoria CRE) consta do quadro 4. Os resultados devem ser interpretados do seguinte modo:

— Considera-se que o produto químico em estudo não necessita de classificação e rotulagem em conformidade com o sistema GHS da ONU e com o CRE (nenhuma categoria) se a percentagem média de viabilidade dos tecidos após exposição e incubação pós-exposição for superior ao valor-limite percentual estabelecido para a viabilidade dos tecidos, indicado no quadro 4. Neste caso, não são necessários ensaios complementares por outros métodos de ensaio.

▼M8

— Se a percentagem média de viabilidade dos tecidos após a exposição e a incubação pós-exposição for inferior ou igual ao valor-limite estabelecido para a percentagem de viabilidade dos tecidos, não é possível efetuar qualquer previsão, como se pode comprovar no quadro 4. Neste caso, serão necessários ensaios complementares por outros métodos de ensaio, dado que os métodos RhCE apresentam um certo número de resultados falsos positivos (ver pontos 14 a 15) e não permitem distinguir entre as categorias 1 e 2 do sistema GHS da ONU e do CRE (ver ponto 17).

Quadro 4

Modelos de previsão de acordo com a classificação GHS da ONU e da CRE

VRM	Nenhuma categoria	Previsão impossível
VRM 1 - EpiOcular™ EIT (para ambos os protocolos)	Viabilidade média dos tecidos > 60 %	Viabilidade média dos tecidos ≤ 60 %
VRM 2 - SkinEthic™ HCE EIT (para protocolos de líquidos)	Viabilidade média dos tecidos > 60 %	Viabilidade média dos tecidos ≤ 60 %
VRM2 - SkinEthic™ HCE EIT (para protocolos de sólidos)	Viabilidade média dos tecidos > 50 %	Viabilidade média dos tecidos ≤ 50 %

45. Se a classificação do produto químico em estudo for inequívoca, basta normalmente um ensaio constituído por, pelo menos, dos replicados de tecidos. Porém, nos casos inconclusivos (por exemplo, medições discordantes dos replicados e/ou percentagem média de viabilidade do tecido igual a 60±5 % (VRM1 e VRM2, no caso do protocolo para líquidos) ou 50 ±5 % (VRM2, no caso do protocolo para sólidos), é de ponderar a realização de um segundo ensaio, bem como de um terceiro se os resultados dos dois primeiros forem discordantes.

46. Para aumentar o desempenho global do método de ensaio para certos tipos de misturas, podem ponderar-se, quando adequado e justificável, valores-limite diferentes, no que respeita à percentagem de viabilidade dos tecidos, para distinguir produtos químicos em estudo classificados e não classificados (ver ponto 14). Os produtos químicos de referência podem ser úteis para avaliar o potencial de lesões oculares graves/irritação ocular dos produtos químicos em estudo ou de produtos desconhecidos de determinadas classes, bem como para avaliar o potencial de toxicidade ocular relativa de um produto químico classificado numa gama específica de respostas positivas.

DADOS E RELATÓRIOS

Dados

47. Para cada produto químico em estudo, devem apresentar-se num quadro os dados relativos aos tecidos individuais replicados numa série de ensaios (por exemplo, valores de DO/áreas de pico do MTT formazano e dados relativos à percentagem calculada de viabilidade dos tecidos e a previsão final do método de ensaio RhCE), incluindo os dados dos ensaios repetidos, se pertinente. Além disso, deve comunicar-se a percentagem média de viabilidade dos tecidos e a diferença de viabilidade entre dois tecidos replicados (se n = 2 tecidos replicados) ou o DP (se n ≥ 3 tecidos replicados), para cada produto químico em estudo e para cada amostra de controlo. Devem também comunicar-se as eventuais interferências do produto químico em estudo com a medição do MTT formazano, expressas na redução direta do MTT e/ou em interferências cromáticas.

Relatório de ensaio

48. O relatório do ensaio deve incluir as seguintes informações:

▼**M8**

Produto químico em estudo

Substância monocomponente:

— Identificação química, como as denominações IUPAC ou CAS, o(s) número(s) de registo CAS, o código SMILES ou InChI, a fórmula estrutural e/ou outros identificadores;

— Estado físico, volatilidade, pH, log(P), peso molecular, classe química e outras propriedades físico-químicas pertinentes para a realização do estudo, na medida em que estejam disponíveis;

— Grau de pureza, identidade química das impurezas, conforme adequado e exequível, etc.;

— Pré-tratamento, se for o caso (aquecimento ou moagem, por exemplo);

— Condições de armazenagem e de estabilidade, se conhecidas.

Substância multicomponentes, UVCB e mistura:

— Caracterização, tanto quanto possível, por exemplo, por identidade química (ver supra), pureza, ocorrência quantitativa e principais propriedades físico-químicas (ver supra) dos componentes, na medida em que estejam disponíveis;

— Estado físico e outras propriedades físico-químicas pertinentes para a realização do estudo, na medida em que estejam disponíveis;

— Grau de pureza, identidade química das impurezas, conforme adequado e exequível, etc.;

— Pré-tratamento, se for o caso (aquecimento ou moagem, por exemplo);

— Condições de armazenagem e de estabilidade, se conhecidas.

Substâncias de controlo positivas e negativas

— Identificação química, como as denominações IUPAC ou CAS, o(s) número(s) de registo CAS, o código SMILES ou InChI, a fórmula estrutural e/ou outros identificadores;

— Estado físico, volatilidade, peso molecular, classe química e outras propriedades físico-químicas pertinentes para a realização do estudo, na medida em que estejam disponíveis;

— Grau de pureza, identidade química das impurezas, conforme adequado e exequível, etc.;

— Pré-tratamento, se for o caso (aquecimento ou moagem, por exemplo);

— Condições de armazenagem e de estabilidade, se conhecidas;

— Se for caso disso, justificação do recurso a um controlo negativo diferente da água ultrapura ou do DPBS sem Ca^{2+}/Mg^{2+};

— Se for caso disso, justificação do recurso a um controlo positivo diferente do acetato de metilo puro;

— Referência a resultados históricos de controlo positivo e negativo que demonstrem critérios de aceitação válidos.

Informações relativas ao patrocinador e ao laboratório

— Nome e endereço do patrocinador, do laboratório e do diretor do estudo.

— *Modelo de tecido RhCE e protocolo utilizados (e fundamentação das escolhas, se for caso disso)*

▼**M8**

Condições do método de ensaio

— O modelo de tecido RhCE utilizado, incluindo o número do lote;

— Comprimento de onda e gama de comprimentos de onda (se pertinente) para quantificar o MTT formazano e gama de linearidade do dispositivo de medição (espetrofotómetro, por exemplo).

— Descrição do método utilizado para quantificar o MTT formazano;

— Descrição do sistema de sistema de espetrofotometria HPLC/UPLC utilizado, se pertinente;

— Informações completas que substanciem o modelo de tecido RhCE utilizado, incluindo dados sobre o respetivo desempenho. Devem incluir, nomeadamente, o seguinte:

i) Controlo de qualidade da viabilidade (fornecedor)

ii) Viabilidade nas condições do método de ensaio (utilizador);

iii) Controlo da qualidade da função de barreira;

iv) Morfologia, se conhecida;

v) Capacidade de reprodutibilidade e de previsão;

vi) Outros controlos de qualidade (QC) do modelo de tecidos RhCE, se pertinente;

— Referência a dados históricos sobre o modelo do tecido RhCE. Deve incluir, nomeadamente, a aceitabilidade dos dados de controlo de qualidade em relação aos dados históricos dos lotes,

— Declaração de que o laboratório de ensaio demonstrou competência técnica para a aplicação do método de ensaio antes da sua utilização regular, tendo procedido ao ensaio dos produtos químicos recomendados para demonstração de competência técnica;

Critérios de aceitação de séries de ensaios e de ensaios

— Meios de controlo positivo e negativo e gamas de aceitação baseadas em dados históricos;

— Variabilidade aceitável entre os tecidos replicados, para os controlos positivos e negativos;

— Variabilidade aceitável entre os tecidos replicados, para o produto químico em estudo;

Procedimento de ensaio

— Elementos sobre o procedimento de ensaio adotado;

— Doses do produto químico em estudo e das substâncias de controlo utilizadas;

— Duração e temperatura da exposição, da imersão pós-exposição e dos períodos de incubação pós-exposição (se pertinente);

— Descrição de eventuais modificações do protocolo do ensaio;

▼**M8**

— Indicação dos controlos utilizados nos redutores diretos do MTT e/ou dos produtos químicos em estudo que apresentem coloração, se pertinente;

— Número de replicados de tecidos utilizados por cada produto químico em estudo e de controlo (NSMTT, NSC_{vivos} e NSC_{mortos}, se pertinente);

Resultados

— Quadro com os dados relativos a todos os produtos químicos e substâncias de controlo de cada série de ensaios (incluindo ensaios repetidos, se pertinente), a todas as medições de replicados – incluindo a densidade ótica (DO) ou a área de pico do MTT formazano –, percentagem de viabilidade dos tecidos, percentagem média de viabilidade dos tecidos, diferenças entre os tecidos replicados, ou DP, e predição final;

— Se for caso disso, os resultados dos controlos utilizados para os redutores diretos do MTT e/ou para os produtos químicos em estudo corados, incluindo o valor da DO ou a área do pico do MTT formazano, % NSMTT, % NSC_{vivos}, % NSC_{mortos}, diferença entre os tecidos replicados ou DP, percentagem final correta de viabilidade dos tecidos e previsão final;

— Resultados obtidos com o(s) produto(s) químico(s) em estudo e as substâncias de controlo no que diz respeito ao(s) critério(s) de definição e de aceitação do ensaio;

— Descrição de quaisquer outros efeitos observados, por exemplo, coloração dos tecidos por um produto químico corado;

Discussão dos resultados

Conclusão

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(1) ONU (2015). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, Sixth Revised Edition, New York and Geneva: United Nations. Disponível em: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ /ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.

(2) Capítulo B.5 do presente anexo, «Irritação/corrosão ocular agudas».

(3) Capítulo B.47 do presente anexo, «Método de ensaio de opacidade e permeabilidade da córnea em bovinos para identificação de produtos químicos indutores de lesões oculares graves e de produtos químicos que não necessitem de ser classificados em termos de irritação ocular nem de lesões oculares graves».

(4) Capítulo B.48 do presente anexo, «Método de ensaio em olhos de frango isolados para identificação de produtos químicos indutores de lesões oculares graves e de produtos químicos que não necessitem de ser classificados em termos de irritação ocular nem de lesões oculares graves».

(5) Capítulo B.61 do presente anexo, «Método de ensaio de difusão de fluoresceína para identificação de corrosivos oculares e de irritantes oculares severos».

▼**M8**

(6) Capítulo B.68 do presente anexo, «Método de ensaio de exposição *in vitro* de curta duração para identificação i) de produtos químicos indutores de lesões oculares graves e ii) de produtos químicos que não necessitam de ser classificados em termos de irritação ocular nem de lesões oculares graves».

(7) Freeman, S.J., Alépée N., Barroso, J., Cole, T., Compagnoni, A., Rubingh, C., Eskes, C., Lammers, J., McNamee, P., Pfannenbecker, U., Zuang, V. (2010). Prospective Validation Study of Reconstructed Human Tissue Models for Eye Irritation Testing. *ALTEX* 27, Special Issue 2010,261-266.

(8) EC EURL ECVAM (2014). The EURL ECVAM - Cosmetics Europe prospective validation study of Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE)-based test methods for identifying chemicals not requiring classification and labelling for serious eye damage/eye irritation: Validation Study Report. EUR 28125 EN; doi:10.2787/41680. Disponível em: http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/ /JRC100280.

(9) EURL ECVAM Science Advisory Committee (2014). ESAC Opinion on the EURL ECVAM Eye Irritation Validation Study (EIVS) on EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE and a related Cosmetics Europe study on HPLC/UPLC-spectrophotometry as an alternative endpoint detection system for MTT-formazan. ESAC Opinion No 2014-03 of 17 November 2014; EUR 28173 EN; doi: 10.2787/043697. Disponível em: http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103702.

(10) Alépée, N., Leblanc, V., Adriaens, E., Grandidier, M.H., Lelièvre, D, Meloni, M., Nardelli, L., Roper, C.S, Santirocco, E., Toner, F., Van Rompay, A., Vinall, J., Cotovio, J. (2016). Multi-laboratory validation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using liquid chemicals. *Toxicol. In Vitro* 31, 43-53.

(11) Alépée, N., Adriaens, E., Grandidier, M.H., Meloni, M., Nardelli, L., Vinall, C.J., Toner, F., Roper, C.S, Van Rompay, A.R., Leblanc, V., Cotovio, J. (2016). Multi-laboratory evaluation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using solid chemicals and overall performance of the test method with regard to solid and liquid chemicals testing. *Toxicol. In Vitro* 34, 55-70.

(12) EURL ECVAM Science Advisory Committee (2016). ESAC Opinion on the SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) Eye Irritation Test (EIT). ESAC Opinion No 2016-02 of 24 June 2016; EUR 28175 EN; doi: 10.2787/390390. Disponível em: http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103704.

(13) EC EURL ECVAM (2016). Recommendation on the Use of the Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) Test Methods for Identifying Chemicals not Requiring Classification and Labelling for Serious Eye Damage/Eye Irritation According to UN GHS. (Manuscrito em preparação).

(14) Draize, J.H., Woodard, G., Calvery, H.O. (1944). Methods for the Study of Irritation and Toxicity of Substances Applied Topically to the Skin and Mucous Membranes. Journal of *Pharmacol. and Exp. Therapeutics* 82, 377-390.

(15) Scott, L., Eskes, C., Hoffmann, S., Adriaens, E., Alépée, N., Bufo, M., Clothier, R., Facchini, D., Faller, C., Guest, R., Harbell, J., Hartung, T., Kamp, H., Le Varlet, B., Meloni, M., McNamee, P., Osborne, R., Pape, W., Pfannenbecker, U., Prinsen, M., Seaman, C., Spielman, H., Stokes, W., Trouba, K., Van den Berghe, C., Van Goethem, F., Vassallo, M., Vinardell, P., Zuang, V. (2010). A Proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *In Vivo* Studies Using Bottom-Up and Top-Down Approaches. *Toxicol. In Vitro* 24, 1-9.

▼**M8**

(16) Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.

(17) OCDE (2016). Series on Testing and Assessment No 216: Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human Cornea-Like Epithelium (RhCE) Test Methods for Identifying Chemicals not Requiring Classification and Labelling for Eye Irritation or Serious Eye Damage, Based on the Validated Reference Methods EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE EIT described in TG 492. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(18) OCDE (2005). Series on Testing and Assessment No 34: Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(19) Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Hayden, P., Kubilus, J., d'Argembeau--Thornton, L., Klausner, M. (2011). Development of the EpiOcular™ Eye Irritation Test for Hazard Identification and Labelling of Eye Irritating Chemicals in Response to the Requirements of the EU Cosmetics Directive and REACH Legislation. *Altern. Lab. Anim.* 39, 339-364.

(20) Nguyen, D.H., Beuerman, R.W., De Wever, B., Rosdy, M. (2003). Three-dimensional construct of the human corneal epithelium for in vitro toxicology. In: Salem, H., Katz, S.A. (Eds), Alternative Toxicological Methods, CRC Press, pp. 147-159.

(21) Pfannenbecker, U., Bessou-Touya, S., Faller, C., Harbell, J., Jacob, T., Raabe, H., Tailhardat, M., Alépée, N., De Smedt, A., De Wever, B., Jones, P., Kaluzhny, Y., Le Varlet, B., McNamee, P., Marrec-Fairley, M., Van Goethem, F. (2013). Cosmetics Europe multi-laboratory pre-validation of the EpiOcular™ reconstituted Human Tissue Test Method for the Prediction of Eye Irritation. *Toxicol. In Vitro* 27, 619--626.

(22) Alépée, N., Bessou-Touya, S., Cotovio, J., de Smedt, A., de Wever, B., Faller, C., Jones, P., Le Varlet, B., Marrec-Fairley, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., van Goethem, F., McNamee, P. (2013). Cosmetics Europe Multi-Laboratory Pre-Validation of the SkinEthic™ Reconstituted Human Corneal Epithelium Test Method for the Prediction of Eye Irritation. *Toxicol. In Vitro* 27, 1476-1488.

(23) Kolle, S.N., Moreno, M.C.R., Mayer, W., van Cott, A., van Ravenzwaay, B., Landsiedel, R. (2015). The EpiOcular™ Eye Irritation Test is the Method of Choice for *In Vitro* Eye Irritation Testing of Agrochemical Formulations: Correlation Analysis of EpiOcular™ Eye Irritation Test and BCOP Test Data to UN GHS, US EPA and Brazil ANIVSA Classifications. *Altern. Lab. Anim.* 43, 1-18.

(24) Adriaens, E., Barroso, J., Eskes, C., Hoffmann, S., McNamee, P., Alépée, N., Bessou-Touya, S., De Smedt, A., De Wever, B., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Zuang, V. (2014). Retrospective Analysis of the Draize Test for Serious Eye Damage/Eye Irritation: Importance of Understanding the *In Vivo* Endpoints Under UN GHS/EU CLP for the Development and Evaluation of *In Vitro* Test Methods. *Arch. Toxicol.* 88, 701-723.

(25) Barroso, J., Pfannenbecker, U., Adriaens, E., Alépée, N., Cluzel, M., De Smedt, A., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Templier, M., McNamee, P. (2017). Cosmetics Europe compilation of historical serious eye damage/eye irritation *in vivo* data analysed by drivers of classification to support the selection of chemicals for development and evaluation of alternative methods/strategies: the Draize eye test Reference Database (DRD). *Arch. Toxicol.* 91, 521-547.

(26) Meloni, M., De Servi, B., Marasco, D., Del Prete, S. (2011). Molecular mechanism of ocular surface damage: Application to an *in vitro* dry eye model on human corneal epithelium. *Molecular Vision* 17, 113-126.

▼**M8**

(27) Hackett, R.B., McDonald, T.O. (1991). Eye Irritation. In *Advances in Modern Toxicology: Dermatoxicology* Marzulli F.N.and Maibach H.I. (Eds.), 4th Edition, pp. 749–815. Washington, DC, USA: Hemisphere Publishing Corporation.

(28) Fox, D.A., Boyes, W.K. (2008). Toxic Responses of the Ocular and Visual System. In Cassaret and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons Klaassen C.D.(Ed.), 7th Edition, pp. 665–697. Withby, ON, Canada: McGraw-Hill Ryerson.

(29) Jester, J.V., Li, H.F., Petroll, W.M., Parker, R.D., Cavanagh, H.D., Carr, G.J., Smith, B., Maurer, J.K. (1998). Area and Depth of Surfactant Induced Corneal Injury Correlates with Cell Death. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 922-936.

(30) Maurer, J.K., Parker, R.D., Jester, J.V. (2002). Extent of Corneal Injury as the Mechanistic Basis for Ocular Irritation: Key Findings and Recommendations for the Development of Alternative Assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36, 106-117.

(31) Jester, J.V., Li, L., Molai, A., Maurer, J.K. (2001). Extent of Corneal Injury as a Mechanistic Basis for Alternative Eye Irritation Tests. *Toxicol. In Vitro* 15, 115-130.

(32) Jester, J.V., Petroll, W.M., Bean, J., Parker, R.D., Carr, G.J., Cavanagh, H.D., Maurer, J.K. (1998). Area and Depth of Surfactant-Induced Corneal Injury Predicts Extent of Subsequent Ocular Responses. *Invest. Ophthalmol.* 39, 2610-2625.

(33) Jester, J.V. (2006). Extent of Corneal Injury as a Biomarker for Hazard Assessment and the Development of Alternative Models to the Draize Rabbit Eye Test. *Cutan. Ocul. Toxicol.* 25, 41-54.

(34) EpiOcular™ EIT SOP, Version 8 (March 05, 2013). EpiOcular™ EIT for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Disponível em: [https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index].

(35) SkinEthic™ HCE EIT SOP, Version 1. (July 20, 2015). SkinEthic™ HCE Eye Irritation Test (EITL for Liquids, EITS for Solids) for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Disponível em: https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index.

(36) Alépée, N., Barroso, J., De Smedt, A., De Wever, B., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Templier, M., McNamee, P. (2015). Use of HPLC/UPLC-Spectrophotometry for Detection of Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)-Based Test Methods Employing the MTT-Reduction Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 29, 741-761.

(37) Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Handa, Y., DeLuca, J., Truong, T., Hunter, A., Kearney, P., d'Argembeau-Thornton, L., Klausner, M. (2015). EpiOcular™ Eye Irritation Test (EIT) for Hazard Identification and Labeling of Eye Irritating Chemicals: Protocol Optimization for Solid Materials and Extended Shipment Times. *Altern. Lab Anim.* 43, 101-127.

(38) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. May 2001. Disponível em: http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf.

(39) OCDE (2017). Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation. Series on Testing and Assessment No 263. ENV Publications, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

▼M8

Apêndice 1

DEFINIÇÕES

Abordagem ascendente: Metodologia por etapas utilizada para produtos químicos que se pense não necessitarem de ser classificados e rotulados em termos de irritação ocular ou de lesões oculares graves; inicia-se com a determinação de produtos químicos que não careçam de classificação e rotulagem (resultado negativo) a partir de outros produtos químicos (resultado positivo).

Abordagem descendente: Metodologia por etapas utilizada para produtos químicos que se suspeite causarem lesões oculares graves; inicia-se com a determinação dos produtos químicos que induzam lesões oculares graves (resultado positivo) a partir de outros produtos químicos (resultado negativo).

Adequação: Relação do ensaio com o efeito em causa; pertinência e utilidade do ensaio para o fim em vista. Traduz a medida em que o ensaio mede ou prevê corretamente o efeito biológico em estudo. A adequação compreende a exatidão (concordância) do método de ensaio (18).

Amostra de controlo negativo: Amostra que contém todos os componentes de um sistema de ensaio e é tratada com uma substância conhecida por induzir uma reação positiva no sistema de ensaio. Esta amostra é preparada juntamente com as amostras tratadas com o produto químico em estudo e as outras amostras de controlo, sendo utilizada para determinar a viabilidade dos tecidos a 100 %.

Amostra de controlo positivo: Amostra que contém todos os componentes de um sistema de ensaio e é tratada com uma substância conhecida por induzir uma reação positiva no sistema de ensaio. Esta amostra tratada juntamente com as amostras tratadas com o produto químico em estudo e as outras amostras de controlo. Para que possa determinar-se a variabilidade no tempo da reação a esta amostra de controlo, essa reação não deve ser excessivamente positiva.

Categoria 1 do sistema GHS da ONU/CRE: Ver «lesões oculares graves».

Categoria 2 do sistema GHS da ONU/CRE: Ver «irritação ocular».

Concordância: Ver «exatidão».

Córnea: Parte anterior transparente do globo ocular que recobre a íris e a pupila e deixa passar a luz para o interior.

CV: Coeficiente de variação.

Dev: Desvio.

DO: Densidade ótica.

DP: Desvio-padrão.

Dose infinita: Quantidade de produto químico em estudo aplicada no tecido RhCE que excede a quantidade necessária para cobrir completa e uniformemente a superfície epitelial.

Efeitos oculares irreversíveis: Ver «lesões oculares graves».

Efeitos oculares reversíveis: Ver «irritação ocular».

▼M8

EIT: Ensaio de irritação ocular.

Ensaio: Um único produto químico em estudo ensaiado em paralelo com, pelo menos, dois tecidos replicados, como definido no PON correspondente.

Ensaio alternativo: Ensaio destinado a substituir um ensaio de rotina aceite para identificação de perigos e/ou avaliação de riscos, que se concluiu proporcionar proteção equivalente, ou melhorar a proteção, da saúde pública e animal ou do ambiente – consoante o caso – comparativamente ao ensaio de rotina aceite, no que respeita a todos os produtos químicos e situações de ensaio possíveis (18).

Especificidade: Proporção dos produtos químicos em estudo negativos/inativos que são corretamente classificados pelo ensaio. Constitui uma medida da exatidão de um método de ensaio cujos resultados são estabelecidos em função de categorias e é um aspeto importante a ter em conta na avaliação da adequação do método (18).

Estratégia de ensaio sequencial por etapas: Estratégia de ensaios por etapas que usa métodos de ensaio de forma sequencial. As informações disponíveis sobre o produto químico em estudo são avaliadas a cada etapa, por um processo baseado na ponderação da suficiência da prova, com o objetivo de determinar se são suficientes para a classificação de perigosidade, antes de passar à etapa seguinte. Se as informações existentes possibilitarem a atribuição de um potencial de perigosidade ao produto químico em estudo numa dada etapa, não serão necessários mais ensaios (18).

EURL ECVAM: Laboratório de referência da União Europeia para as alternativas à experimentação animal.

Exatidão: Grau de acordo entre os resultados do método de ensaio e os valores de referência aceites. Constitui uma medida da eficiência do método e um dos aspetos da «adequação». Este termo e o termo «concordância» são muitas vezes utilizados indistintamente para indicar a proporção de resultados corretos do método de ensaio (18).

ET_{50}: Tempo de exposição necessário para reduzir a viabilidade do tecido em 50 % após aplicação de uma concentração específica e fixa de um produto químico de referência.

Fiabilidade: Medida em que, utilizando o mesmo protocolo, um método de ensaio pode ser continuadamente reproduzido no mesmo laboratório e em laboratórios diferentes. A fiabilidade é avaliada com base nos valores calculados das reprodutibilidades intralaboratorial e interlaboratorial, bem como da repetibilidade intralaboratorial (18).

Irritação ocular: Alterações oculares decorrentes da aplicação do produto químico em estudo na superfície anterior do olho, totalmente reversíveis nos 21 dias após a aplicação. Esta expressão, bem como as expressões «efeitos oculares reversíveis» ou «categoria 2 do sistema GHS da ONU/CRE», são utilizadas indistintamente.

Lesões oculares graves: Lesão do tecido ocular ou degradação grave da visão decorrente da aplicação de um produto químico em estudo na superfície anterior do olho, não totalmente reversível nos 21 dias após a aplicação. Esta expressão, bem como as expressões «efeitos oculares irreversíveis» ou «categoria 1 do sistema GHS da ONU/CRE», são utilizadas indistintamente.

LLOQ: Limite de quantificação inferior.

Log(P): Logaritmo do coeficiente de repartição octanol/água.

Método de ensaio válido: Método de ensaio cuja importância e cuja fiabilidade são consideradas suficientes para um objetivo específico e que se baseia em princípios cientificamente sólidos. Um método de ensaio nunca é válido em sentido absoluto, mas apenas em relação a um determinado objetivo (18).

Método de ensaio validado: Método de ensaio relativamente ao qual foram concluídos estudos de validação com vista a determinar a sua adequação (incluída a exatidão) e a sua fiabilidade para um determinado fim. Importa referir que um método de ensaio validado pode não ser suficientemente exato e fiável para ser considerado aceitável para o fim pretendido (18).

Mistura: Uma mistura ou solução composta por duas ou mais substâncias.

MTT: Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]; brometo de tiazolilo; azul de tetrazólio.

▼M8

Não classificado: Produtos químicos não classificados em termos de irritação ocular (categoria 2 do sistema GHS da ONU/CRE, categorias 2A ou 2B do sistema GHS da ONU) ou de lesões oculares graves (categoria 1 do sistema GHS da ONU/CRE). Designação utilizada indistintamente com a classificação «nenhuma categoria» no sistema GHS da ONU/CRE.

«Nenhuma categoria» do sistema GHS da ONU/CRE: Produtos químicos que não satisfaçam os requisitos para classificação nas categorias 1 ou 2 do sistema GHS da ONU/CRE (ou na categoria 2A ou 2B do sistema GHS da ONU). Esta expressão e a expressão «não classificado» são utilizadas indistintamente.

Normas de desempenho: Normas baseadas um método de referência validado que tenha sido considerado cientificamente válido e que constituem a base para a avaliação da comparabilidade de um método de ensaio proposto mecanística e funcionalmente similar. Incluem-se: i) componentes essenciais do método de ensaio; ii) uma lista mínima de produtos químicos de referência, escolhidos de entre os produtos químicos utilizados para demonstrar o desempenho aceitável do método de ensaio validado; iii) níveis de exatidão e fiabilidade comparáveis, baseados no que foi obtido para o método de ensaio validado, que o método de ensaio proposto deve demonstrar quando avaliado pela utilização da lista mínima de produtos químicos de referência (18).

NSMTT: Redução não específica do MTT.

NSC_{mortos}: Cor não específica em tecidos mortos.

NSC_{vivos}: Cor não específica em tecidos vivos.

Perigo: Propriedade intrínseca de um agente, ou de uma situação, suscetível de causar efeitos nocivos num organismo, sistema, população ou subpopulação exposto ao agente em causa.

Ponderação da suficiência da prova: Processo que consiste em ponderar os pontos fortes e fracos dos vários elementos de informação para tirar conclusões fundamentadas sobre o potencial de perigosidade do produto químico em estudo.

Procedimentos operacionais normalizados (PON): Procedimentos formais e escritos que descrevem em pormenor o modo como devem ser realizadas as operações laboratoriais de rotina e as específicas do ensaio. São previstos pelo CRE.

Produto químico: Uma substância ou mistura.

Produto químico de referência: Produto químico utilizado como padrão de comparação com o produto químico em estudo. Um produto químico de referência deve ter as seguintes propriedades: (i) origem ou origens uniformes e fiáveis para a sua identificação e caracterização; (ii) similaridade estrutural, funcional e/ou química com a classe de produtos químicos em estudo; (iii) características físico-químicas conhecidas; (iv) existência de dados sobre os efeitos conhecidos; e v) representatividade conhecida, situada na gama de reação pretendida.

Produto químico em estudo: Qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado o presente método de ensaio.

Reprodutibilidade: Acordo entre resultados obtidos em ensaios com o mesmo produto químico, utilizando o mesmo protocolo de ensaio (ver «fiabilidade») (18).

▼M8

RhCE: Epitélio corneano humano reconstruído.

Sensibilidade: Proporção dos produtos químicos em estudo positivos/ativos que são corretamente classificados pelo ensaio. Constitui uma medida da exatidão de um método de ensaio cujos resultados sejam estabelecidos em função de categorias e é um aspeto importante a ter em conta na avaliação da adequação do método (18).

Série de ensaios: Uma série de ensaios consiste no ensaio de um ou mais produtos químicos em estudo em paralelo com um controlo negativo e um controlo positivo.

Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos das Nações Unidas (em inglês: *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals* – UN GHS): Sistema que propõe a classificação dos produtos químicos (substâncias e misturas) em função de tipos e níveis normalizados de perigos físicos, sanitários e ambientais e trata ainda dos correspondentes elementos de comunicação, como pictogramas, palavras-sinal, advertências de perigo, recomendações de prudência e fichas de dados de segurança, de modo a transmitir informações sobre os efeitos indesejáveis do produto em causa, com vista à proteção das pessoas (empregadores, trabalhadores, transportadores, consumidores, pessoal dos serviços de emergência, etc.) e do ambiente (1).

Substância: Um elemento químico e os seus compostos, no estado natural ou obtidos por qualquer processo de produção, incluindo os aditivos necessários para preservar a sua estabilidade e qualquer impureza derivada do processo utilizado, mas excluindo os solventes que possam ser separados sem afetar a estabilidade da substância nem modificar a sua composição.

Substância monocomponentes: Substância, definida pela sua composição quantitativa, na qual um dos principais componentes está presente num teor de, pelo menos, 80 % (m/m).

Substância multicomponentes: Substância, definida pela sua composição quantitativa, da qual mais de um dos principais componentes está presente numa concentração $\geq$ 10 % (m/m) e $<$ 80 % (m/m). As substâncias multicomponentes resultam de processos de fabrico. A diferença entre uma mistura e uma substância multicomponentes reside no facto de a primeira ser obtida misturando duas ou mais substâncias, sem reação química. As substâncias multicomponentes resultam de reações químicas.

Taxa de falsos negativos: Proporção das substâncias positivas que o método de ensaio considera erradamente negativas. É um dos indicadores da eficiência dos métodos.

Taxa de falsos positivos: Proporção das substâncias negativas que o método de ensaio considera erradamente positivas. É um dos indicadores da eficiência dos métodos.

ULOQ: Limite de quantificação superior.

UPLC: Cromatografia líquida de muito alta resolução.

UVCB: Substâncias de composição desconhecida ou variável, produtos de reação complexos ou matérias biológicas.

▼**M8**

Viabilidade dos tecidos: Parâmetro que mede a atividade total de uma população celular num tecido reconstruído e a sua capacidade para reduzir o corante vital MTT, capacidade esse que, consoante o parâmetro determinado e do tipo de ensaio realizado, está correlacionada com o número total de células vivas e/ou com a vitalidade dessas células.

VRM: Método de referência validado.

VRM1: O EIT da EpiOcular™ é referido como «método de referência validado 1».

VRM2: O EIT HCE da SkinEthic™ é referido como «método de referência validado 2».

▼M8

Apêndice 2

PRINCIPAIS COMPONENTES DOS ENSAIOS RHCE VALIDADOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE PRODUTOS QUÍMICOS QUE NÃO NECESSITAM DE CLASSIFICAÇÃO E ROTULAGEM EM MATÉRIA DE IRRITAÇÃO OCULAR OU LESÕES OCULARES GRAVES

Componentes do ensaio	EIT da EpiOcular™ (VRM 1)		EIT HCE da SkinEthic™ (VRM 2)	
Protocolos	Líquidos (pipetáveis a 37 ^{o}C ±1 ^{o}C ou a temperaturas mais baixas durante 15 min)	Sólidos (não pipetáveis)	Líquidos e viscosos (pipetáveis)	Sólidos (não pipetáveis)
Superfície do modelo	0,6 cm^2	0,6 cm^2	0,5 cm^2	0,5 cm^2
Número de tecidos replicados	Pelo menos 2	Pelo menos 2	Pelo menos 2	Pelo menos 2
Controlo prévio de interferência cromática	50 µl + 1 ml H_2O durante 60 min a 37±2^{o}C, 5±1 % CO_2, ≥ 95 % RH (produtos químicos em estudo não corados), ou 50 µl +2 ml de mistura de isopropanol durante 2--3 horas à temperatura ambiente (produtos químicos corados) → Se a densidade ótica do produto químico em estudo a 570±20 nm, após subtração da densidade ótica do isopropanol ou da água, for superior a 0,08 (o que corresponde a cerca de 5 % da DO total do controlo negativo), devem realizar-se controlos adaptados *in vivo*.	50 mg + 1 ml H_2O durante 60 min a 37±2^{o}C, 5±1 % CO_2, ≥ 95 % à temperatura ambiente (produtos químicos não corados) e/ou 50 mg +2 ml de mistura de isopropanol durante 2 a 3 horas à temperatura ambiente (produtos químicos de ensaio corados e não corados) → Se a densidade ótica do produto químico em estudo a 570±20 nm, após subtração da densidade ótica do isopropanol ou da água, for superior a 0,08 (o que corresponde a cerca de 5 % do total da DO de controlo negativo), devem realizar-se controlos adaptados *in vivo*.	10 µl + 90 µl H_2O misturados durante 30 ±2 min à temperatura ambiente (temperatura ambiente: 18-28 ^{o}C) → se o produto químico em estudo for corado, devem realizar-se controlos adaptados *in vivo*	10 mg + 90 µl H_2O misturados durante 30±2 min à temperatura ambiente → se o produto químico em estudo for corado, devem realizar-se controlos adaptados *in vivo*

▼M8

Componentes do ensaio	EIT da EpiOcular™ (VRM 1)		EIT HCE da SkinEthic™ (VRM 2)	
Controlo prévio da redução direta do MTT	50 µl+1 ml de MTT 1 mg/ml de solução durante 180±15 min a 37±2 °C, 5±1 % de CO_2, ≥ 95 % de humidade relativa → se a solução ficar de cor azul/púrpura, devem realizar-se controlos adaptados «mortos por congelamento» (utilizam-se como controlo negativo 50 µl de água desionizada estéril numa solução de MTT)	50 mg + 1 ml MTT 1 mg/ml de solução durante 180 ±15 min a 37±2 °C, 5±1 % de CO_2, ≥ 95 % de humidade relativa → se a solução ficar azul/púrpura, devem realizar-se controlos adaptados «mortos por congelamento». (utilizam-se como controlo negativo 50 µl de água desionizada estéril numa solução de MTT).	30 µl + 300 µl MTT 1 mg/ml de solução durante 180±15 min a 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % de humidade relativa → se a solução ficar azul/púrpura, devem realizar-se controlos adaptados à água (utilizam-se como controlo negativo 30 µl de água desionizada estéril numa solução de MTT).	30 mg +300 µl de MTT → S1 mg/ml de solução durante 180±15 min a 37±2 °C, 5±1 % de CO_2, ≥95 % de humidade relativa se a solução ficar azul/púrpura, devem realizar-se controlos adaptados à água (utilizam-se como controlo negativo 30 µl de água desionizada estéril numa solução de MTT).
Pré-tratamento	20 µl de DPSB sem Ca^{2+}/Mg^{2+} durante 30 ± 2 min a 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥ 95 % de humidade relativa, ao abrigo da luz.	20 µl de DPSB sem Ca^{2+}/Mg^{2+} durante 30 ± 2 min a 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥ 95 % de humidade relativa, ao abrigo da luz.	-	-
Doses e aplicação do tratamento	50 µl (83,3 µl/cm^2)	50 mg (83,3 mg/cm^2) utilizando um aparelho calibrado (por exemplo, uma colher nivelada calibrada para conter 50 mg de cloreto de sódio).	10 µl de DPSB sem Ca^{2+}/Mg^{2+}+ 30 ± 2 µl (60 µl/cm^2) Para produtos viscosos, utilizar uma malha de *nylon*	30 µl de DPSB sem Ca^{2+}/Mg^{2+}+ 30 ± 2 mg (60 mg/cm^2)
Tempo e temperaturade exposição	30 min (± 2 min) em meio de cultura a 37±2 °C, 5±1 % de CO_2, ≥ 95 % de humidade relativa	6 horas (± 0,25 h) em meio de cultura a 37±2 °C, 5±1 % de CO_2, ≥ 95 % de humidade relativa	30 min (± 2 min) em meio de cultura a 37±2 °C, 5±1 % de CO_2, ≥ 95 % de humidade relativa	4 horas (± 0,1 h) em meio de cultura a 37±2 °C, 5±1 % de CO_2, ≥ 95 % de humidade relativa
Lavagem à temperatura ambiente	3 vezes em 100 ml de DPSB sem Ca^{2+}/Mg^{2+}	3 vezes em 100 ml de DPSB sem Ca^{2+}/Mg^{2+}	20 ml de DPSB sem Ca^{2+}/Mg^{2+}	25 ml de DPSB sem Ca^{2+}/Mg^{2+}
Imersão pós-exposição	12 min (± 2 min) à temperatura ambiente em meio de cultura	25 min (± 2 min) à temperatura ambiente em meio de cultura	30 min (± 2 min) a 37 °C, 5 % CO_2, 95 % de humidade relativa em meio de cultura	30 min (± 2 min) à temperatura ambiente em meio de cultura

▼M8

Componentes do ensaio	EIT da EpiOcular™ (VRM 1)		EIT HCE da SkinEthic™ (VRM 2)	
Incubação pós-exposição	120 min (± 15 min) em meio de cultura a 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥ 95 % de humidade relativa	18 h (± 0,25 h) em meio de cultura a 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥ 95 % de humidade relativa	nenhuma	18 h (± 0,5 h) em meio de cultura a 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥ 95 % de humidade relativa
Controlo negativo	50 µl H_2O Ensaio paralelo	50 µl H_2O Ensaio paralelo	30 ±2µl de DPBS sem Ca^{2+}/ /Mg^{2+} Ensaio paralelo	30 ±2µl de DPBS sem Ca^{2+}/ /Mg^{2+} Ensaio paralelo
Controlo positivo	50 µl de acetato de metilo Ensaio paralelo	50 µl de acetato de metilo Ensaio paralelo	30±2 µl de acetato de metilo Ensaio paralelo	30±2 µl de acetato de metilo Ensaio paralelo
Solução de MTT	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml
Tempo e temperaturade incubação do MTT	180 min (± 15 min) a 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥ 95 % de humidade relativa	180 min (± 15 min) a 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥ 95 % de humidade relativa	180 min (± 15 min) a 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥ 95 % de humidade relativa	180 min (± 15 min) a 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥ 95 % de humidade relativa
Extração do solvente	2 ml de isopropanol (extração da superfície e do fundo da inserção por perfuração do tecido)	2 ml de isopropanol (extração do fundo da inserção por perfuração do tecido)	1,5 ml de isopropanol (extração da superfície e do fundo da inserção)	1,5 ml de isopropanol (extração do fundo da inserção)
Tempo e temperatura de extração	2-3 horas com agitação (~20 rpm) à temperatura ambiente ou de um dia para o outro a 4-10 °C	2-3 horas com agitação (~20 rpm) à temperatura ambiente ou de um dia para o outro a 4-10 °C	4 h com agitação (~120 rpm) à temperatura ambiente ou, pelo menos, de um dia para o outro, sem agitação, a 4-10 °C	Pelo menos 2 horas com agitação (~120 rpm), à temperatura ambiente
Leitura da densidade ótica	570 nm (550 - 590 nm) sem filtro de referência	570 nm (550 - 590 nm) sem filtro de referência	570 nm (540 - 600 nm) sem filtro de referência	570 nm (540 - 600 nm) sem filtro de referência
Controlo da qualidade dos tecidos	Tratamento com 100 µl de Triton X-100 a 0,3 % 12,2 min ≤ ET_{50} ≤ 37,5 min	Tratamento com 100 µl de Triton X-100 a 0,3 % 12,2 min ≤ ET_{50} ≤37,5 min	30 minutos de tratamento com SDS (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤3,5 mg/ml	30 minutos de tratamento com SDS (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,2 mg/ml

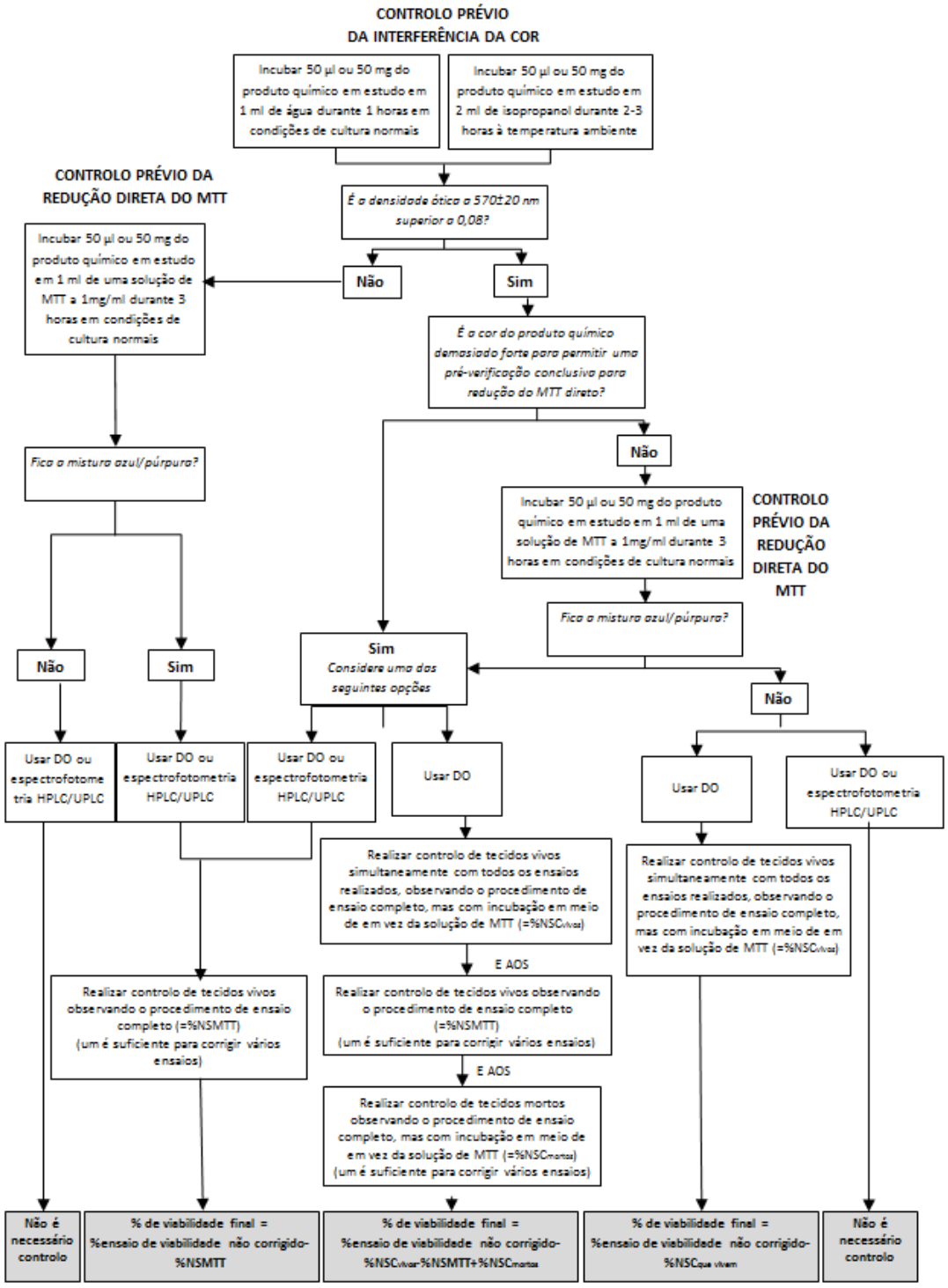
▼M8

Componentes do ensaio	EIT da EpiOcular™ (VRM 1)		EIT HCE da SkinEthic™ (VRM 2)	
Critérios de aceitação	1. A densidade média dos replicados tratados com o controlo negativo deve ser > 0,8 e < 2,5 2. A viabilidade média dos tecidos replicados expostos durante 30 minutos com o controlo positivo, expressa em % da amostra de controlo negativa, deve ser < 50 %. 3. A diferença de viabilidade entre dois tecidos replicados deve ser inferior a 20 %.	1. A densidade média dos replicados tratados com o controlo negativo deve ser > 0,8 e < 2,5 2. A viabilidade média dos tecidos replicados expostos durante 6 horas com o controlo positivo, expressa em % da amostra de controlo negativa, deve ser < 50 %. 3. A diferença de viabilidade entre dois tecidos replicados deve ser inferior a 20 %.	1. A densidade média dos replicados tratados com o controlo negativo deve ser > 1,0 e ≤ 2,5 2. A viabilidade média dos replicados de tecidos expostos durante 30 minutos com o controlo positivo, expressa em % do controlo negativo, deve ser ≤ 30 % 3. A diferença de viabilidade entre dois tecidos replicados deve ser inferior a 20 %.	1. A densidade média dos tecidos replicados tratados com o controlo negativo deve ser > 1,0 e ≤ 2,5 2. A viabilidade média dos tecidos replicados expostos durante 4 horas com o controlo positivo, expressa em % do controlo negativo, deve ser ≤ 20 % 3. A diferença de viabilidade entre dois tecidos replicados deve ser inferior a 20 %.

▼**M8**

Apêndice 3

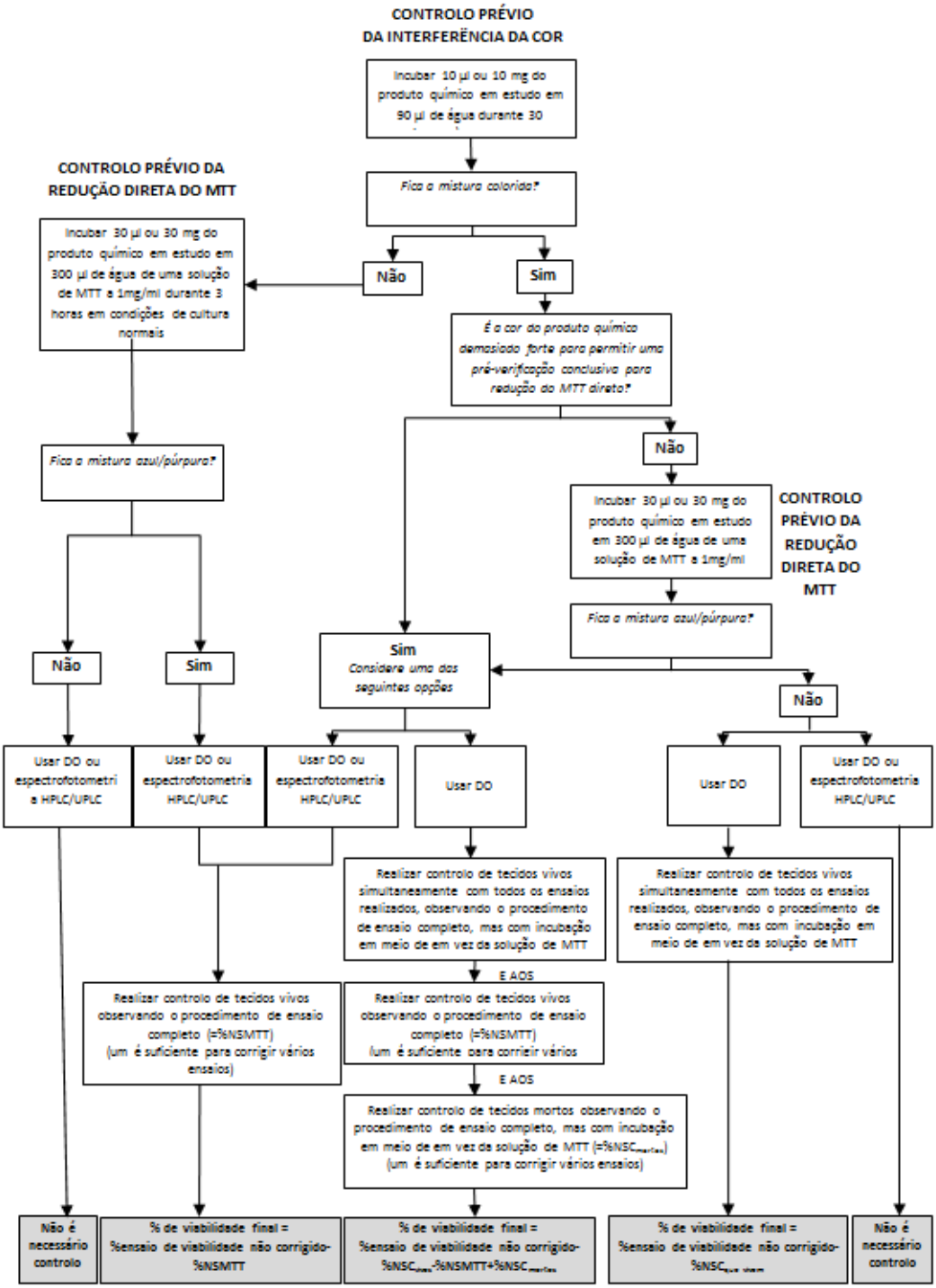
FLUXOGRAMA ILUSTRATIVO DE ORIENTAÇÃO PARA IDENTIFICAR E MANUSEAR OS REDUTORES DIRETOS DO MTT E/OU OS PRODUTOS QUÍMICOS INTERFERENTES CROMÁTICOS COM BASE NOS PON DO VRM1



▼**M8**

Apêndice 4

FLUXOGRAMA ILUSTRATIVO DE ORIENTAÇÃO PARA IDENTIFICAR E MANUSEAR OS REDUTORES DIRETOS DO MTT E/OU OS PRODUTOS QUÍMICOS INTERFERENTES CROMÁTICOS COM BASE NOS PON DO VRM2



▼**M8**

Apêndice 5

PRINCIPAIS PARÂMETROS E CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO PARA A QUALIFICAÇÃO DE UM SISTEMA DE ESPETROFOTOMETRIA HPLC/UPLC PARA MEDIÇÃO DO MTT FORMAZANO EXTRAÍDO DE TECIDOS RHCE

Parâmetro	Protocolo derivado do documento de orientação da FDA (36) (38)	Critérios de aceitação
Seletividade	Análise do isopropanol, em branco vivo (extrato de isopropanol extraído de tecido RhCE vivo sem qualquer tratamento), em branco morto (extrato de isopropanol sem qualquer tratamento extraído de tecido RhCE morto sem qualquer tratamento) e de um corante (por exemplo, azul de metileno)	$Área_{interferência} \leq 20$ % da $Área_{LLOQ}$ (1)
Precisão	Controlos de qualidade (MTT formazano a 1,6 μg/ml, 16 μg/ml e 160 μg/ml) em isopropanol (n = 5)	CV ≤ 15 % or ≤ 20 % para o LLOQ
Exatidão	Controlos de qualidade em isopropanol (n = 5)	% Dev ≤ 15 % ou ≤ 20 % para LLOQ
Efeito matriz	Controlos de qualidade em branco vivo (n = 5)	85 % ≤ % efeito de matriz ≤ 115 %
Passagem	Análise de isopropanol após um padrão ULOQ (2)	$Área_{interferência} \leq 20$ % da $Área_{LLOQ}$
Reprodutibilidade (intradiária)	3 curvas de calibração independentes (com base em 6 diluições consecutivas de 1/3 de MTT formazano em isopropanol, com início em ULOQ, isto é, 200 μg/ml); Controlos de qualidade em isopropanol (n = 5)	Curvas de calibração: % Dev ≤ 15 % ou ≤ 20 % para LLOQ Controlos de qualidade: % Dev ≤ 15 % e CV ≤ 15 %
Reprodutibilidade (intradiária)	Dia 1: 1 curva de calibração e controlos de qualidade no isopropanol (n = 3) Dia 2: 1 curva de calibração e controlos de qualidade no isopropanol (n = 3) Dia 3: 1 curva de calibração e controlos de qualidade no isopropanol (n = 3)	
Estabilidade a curto prazo do MTT formazano em extratos de tecidos RhCE	Controlos de qualidade em branco vivo (n = 3), analisados no dia da preparação e após 24 horas de armazenagem à temperatura ambiente.	% Dev ≤ 15 %
Estabilidade a longo prazo do MTT formazano em extratos de tecidos RhCE, se necessário	Controlos de qualidade em branco vivo (n = 3), analisados no dia da preparação e após vários dias de armazenagem a -20 °C	% Dev ≤ 15 %

(1) LLOQ: Limite inferior de quantificação, definido de forma a abranger 1-2 % de viabilidade dos tecidos, ou seja, 0,8 μg/ml.

(2) ULOQ: Limite superior de quantificação, definido como pelo menos duas vezes superior à mais elevada concentração de MTT formazano em extratos de isopropanol obtidos de controlos negativos (~70 μg/ml no VRM), ou seja, 200 μg/ml.

▼M8

B.70. ENSAIOS *IN VITRO* DE RECETOR DE ESTROGÉNIO HUMANO RECOMBINANTE PARA DETEÇÃO DE PRODUTOS QUÍMICOS COM AFINIDADE LIGANTE COM O ER

INTRODUÇÃO GERAL

Método de ensaio baseado na *Test Guideline* da OCDE

1. O presente método de ensaio é equivalente à *Test Guideline* 493 (2015) da OCDE. A Test Guideline 493 é uma diretriz de ensaio baseada no desempenho (PBTG), que descreve a metodologia para os ensaios *in vitro* de recetor de estrogénio humano recombinante para a deteção de produtos químicos com afinidade ligante com recetores de estrogénios (ensaios de ligação do hrER). É composto por vários métodos de ensaio mecânica e funcionalmente semelhantes para a identificação de ligantes do recetor de estrogénio (i.e., ERα) e deve facilitar o desenvolvimento de métodos de ensaio novos ou modificados de acordo com os princípios de validação estabelecidos no *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Composição for Hazard Assessment* (1) da OCDE. Os métodos de ensaio de referência inteiramente validados (apêndice 2 e apêndice 3) que constituem a base deste PBTG são:

— O In Vitro *Estrogen Recetor (ER) Binding Assay Using a Full Length Human Recombinant ERα* [ensaio *in vitro* de ligação do recetor de estrogénio com um ERα recombinante inteiro humano] de Freyberger-Wilson (FW) (2) e

— O In Vitro *Estrogen Recetor Binding Assay Using a Human Recombinant Ligand Binding Domain Protein* (ensaio *in vitro* de ligação do recetor de estrogénio através de uma proteína ligando recombinante de ligação do Chemical Evaluation and Research Institute (CERI) (2).

Existem normas de desempenho (PS) (3) para facilitar o desenvolvimento e a validação de métodos de ensaio similares para o mesmo parâmetro de perigo e permitir a alteração oportuna do PBTG 493, por forma a que possam ser adicionados novos ensaios similares a um PBTG atualizado. No entanto, só serão adicionados ensaios semelhantes após análise e aprovação pela OCDE do cumprimento das normas de desempenho. Os ensaios incluídos no método TG 493 podem ser utilizados indiscriminadamente para satisfazer as necessidades dos países membros da OCDE quanto a resultados de ensaios de ligação de recetores de estrogénio, beneficiando, em simultâneo, da aceitação mútua de dados da OCDE.

Antecedentes e princípios dos ensaios incluídos no presente método de ensaio

2. A OCDE iniciou em 1998 uma atividade altamente prioritária com o objetivo de rever as diretrizes em vigor para a pesquisa e o ensaio de produtos químicos com possíveis efeitos de perturbação endócrina, bem como de estabelecer novas diretrizes. O quadro conceptual da OCDE para ensaio e avaliação de produtos químicos potencialmente perturbadores do sistema endócrino foi revisto em 2012. O quadro conceptual original e o quadro revisto constam, como anexo, do *Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption* (4). O quadro conceptual inclui cinco níveis, correspondendo cada nível a um nível diferente de complexidade biológica. Os ensaios de ligação do RE descritos no presente método de ensaio são de nível 2, que abrange ensaios *in vitro* que proporcionam dados sobre um ou vários mecanismos/vias endócrinos selecionados. O método refere-se a ensaios de ligação de recetores *in vitro*, concebidos para identificar ligandos para o recetor de estrogénios humanos alfa (ERα).

▼**M8**

3. A relevância do ensaio de ligação do ER *in vitro* para funções biológicas já foi claramente demonstrada. Os ensaios de ligação do ER são concebidos para identificar produtos químicos suscetíveis de perturbar a via hormonal do estrogénio e têm sido amplamente utilizados nas duas últimas décadas para caracterizar a distribuição dos tecidos do ER, bem como para identificar agonistas/antagonistas do ER. Estes ensaios refletem a interação ligando-recetor, que constitui a primeira etapa da via de sinalização do estrogénio e é essencial para a função reprodutora em todos os vertebrados.

4. A interação dos estrogénios com os ER pode afetar a transcrição dos genes controlados pelo estrogénio e induzir efeitos não genómicos passíveis de conduzir à indução ou inibição de processos celulares, incluindo os necessários para a proliferação celular, o desenvolvimento fetal normal e a função reprodutora (5) (6) (7). A perturbação dos sistemas estrogénicos normais pode provocar efeitos nocivos no desenvolvimento normal (ontogénese), na saúde reprodutiva e na integridade do aparelho reprodutor. Uma sinalização inadequada do ER pode provocar efeitos como o aumento de risco de cancro hormono-dependente, perturbações da fertilidade e alterações no crescimento e desenvolvimento fetais (8).

5. Os ensaios obrigatórios *in vitro* baseiam-se numa interação direta de uma substância com um ligando de ligação do recetor específico que regula a transcrição génica. O principal componente do ensaio de ligação do recetor de estrogénio alfa recombinante humano (hrERα) mede a capacidade de um ligando com marcação radioativa ([^{3}H]17β-estradiol) para se fixar ao ER na presença de concentrações crescentes de um produto químico concorrente Os produtos químicos em estudo que possuem uma elevada afinidade para o ER competem com o ligando com marcação radioativa a uma concentração mais baixa comparativamente com os produtos químicos com menor afinidade para o recetor. O presente ensaio é composto por dois componentes principais: uma experiência de ligantes por saturação com vista a caracterizar os parâmetros da interação recetor-ligando e a documentação da especificidade do ER, seguida de uma experiência de ligantes competitivos que caracteriza a concorrência entre um produto químico em estudo e um ligando com marcação radioativa para ligação ao ER.

6. Os estudos de validação do CERI e os ensaios de ligação de FW demonstraram a sua adequação e fiabilidade para o fim a que se destinam (2).

7. As definições e abreviaturas utilizadas no presente método de ensaio constam do apêndice 1.

Âmbito de aplicação e limitações relacionadas com os ensaios de ligação do recetor

8. Estes ensaios são propostos para efeitos de análise e de definição de prioridades, mas podem também fornecer informações para um evento de iniciação molecular (MIE) passível de ser utilizado numa abordagem de ponderação da suficiência da prova. Abordam a ligação do produto químico ao domínio de ligação do ligando do ERα num sistema *in vitro*. Os resultados não devem, pois, ser extrapolados diretamente para o complexo de sinalização e regulação do sistema endócrino intacto *in vivo*.

▼**M8**

9. A ligação do ligando natural (17β-estradiol) constitui a primeira etapa de uma série de eventos moleculares que ativam a transcrição dos genes-alvo e, em última análise, culminam numa mudança fisiológica (9). Assim, a ligação ao domínio de ligação do ligando do ERα é considerada um dos principais mecanismos da desregulação do sistema endócrino (ED) mediada pelo ER, embora haja outros mecanismos através dos quais pode ocorrer a desregulação do sistema endócrino, incluindo: i) interações com pontos de ERα diferentes da bolsa de ligação do ligando; ii) interações com outros recetores relevantes para a sinalização do estrogénio, recetores de estrogénios emparelhados com o ERα e proteína-G e outros recetores e sistemas enzimáticos do sistema endócrino; iii) a síntese hormonal; iv) ativação metabólica e/ou a inativação hormonal; v) distribuição de hormonas aos tecidos-alvo; vi) eliminação de hormonas do organismo. Nenhum dos ensaios segundo o presente método aborda estes modos de ação.

10. O presente método de ensaio incide na capacidade das substâncias de se fixarem ao ERα humano e não estabelece qualquer distinção entre agonistas ou antagonistas do ERα. Os ensaios não abordam outros eventos a jusante, como a transcrição génica ou as alterações fisiológicas. Tendo em conta que, durante a validação, apenas foram utilizadas substâncias monocomponentes, não foi abordada a aplicabilidade ao estudo de misturas. Considera-se, porém, que os ensaios são tecnicamente aplicáveis a substâncias e misturas multicomponentes. Antes da aplicação do método de ensaio a uma mistura para obter dados com fins normativos, importa ponderar se – e, em caso afirmativo, por que motivo – o método pode proporcionar resultados adequados para o efeito. Essas considerações não são necessárias se existir um requisito normativo para o ensaio da mistura.

11. Os sistemas recetores sem células não têm capacidade metabólica intrínseca e não foram validados em combinação com sistemas enzimáticos metabólicos. No entanto, poderá ser possível integrar a atividade metabólica numa conceção do estudo, mas isso exigirá novos esforços de validação.

12. Os produtos químicos suscetíveis de desnaturarem as proteínas do recetor, como os tensioativos ou as substâncias químicas que possam alterar o pH do tampão de ensaio, não podem ser ensaiados, ou apenas o podem ser em concentrações que não provoquem tais interações. Caso contrário, a gama de concentrações que pode ser estudada nos ensaios de um produto químico em estudo é limitada pela sua solubilidade no tampão.

13. A título informativo, o quadro 1 fornece os resultados do ensaio para as 24 substâncias que foram ensaiadas em ambos os ensaios plenamente validados descritos no presente método. Destas substâncias, 17 são classificadas como ligantes do ER e 6 como não ligantes, com base em relatórios publicados, incluindo ensaios *in vitro* para a ativação transcricional do ER e/ou o ensaio uterotrófico (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15). Em referência aos dados resumidos no quadro 1, houve um acordo de quase 100 % entre os dois ensaios sobre as classificações de todas as substâncias até 10^{-4} M, e cada substância foi corretamente classificada como ligante ou não ligante. Durante os estudos de validação, são fornecidas informações suplementares sobre este grupo de substâncias, bem como sobre outras substâncias ensaiadas com os ensaios de ligação para efeitos de ER nos estudos de validação, de acordo com as normas de desempenho para o ensaio vinculativo (3), apêndice 2 (quadros 1, 2 e 3).

▼M8

Quadro 1

Classificação de substâncias como ligantes ou não ligantes quando ensaiados com os ensaios de ligação de FW e do de hrER do CERI hrER, em comparação com a resposta esperada

	Denominação da substância	N.º CAS	Resposta esperada	Ensaio de FW		Ensaio do CERI		Produto químico MESH Classe	Classe de produto
				Concentração Gama (M)	Classificação	Concentração Gama (M)	Classificação		
1	17β-Estradiol	50-28-2	*Ligante*	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Ligante	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Ligante	Esteroide	Produto farmacêutico, agente veterinário
2	Noretinodrel	68-23-5	*Ligante*	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	Ligante	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	Ligante	Esteroide	Produto farmacêutico, agente veterinário
3	Norentindrona	68-22-4	*Ligante*	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	Ligante	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	Ligante	Esteroide	Produto farmacêutico, agente veterinário
4	Ftalato de di-*n*-butilo	84-74-2	*Não ligante* (*)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Não ligando (**) (†)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Não ligando (**) (†)	Hidrocarboneto cíclico, éster	Plastificante, Produto químico intermédio
5	DES	56-53-1	*Ligante*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligante	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligante	Hidrocarboneto cíclico, fenol	Produto farmacêutico, agente veterinário
6	17α-Etinilestradiol	57-63-6	*Ligante*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligante	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligante	Esteroide	Produto farmacêutico, agente veterinário
7	Meso-hexesterol	84-16-2	*Ligante*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligante	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligante	Hidrocarboneto cíclico, fenol	Produto farmacêutico, agente veterinário
8	Genisteína	446-72-0	*Ligante*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligante	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligante	Hidrocarboneto heterocíclico, flavonoide	Produto natural

▼M8

	Denominação da substância	N.º CAS	Resposta esperada	Ensaio de FW		Ensaio do CERI		Produto químico MESH Classe	Classe de produto
				Concentração Gama (M)	Classificação	Concentração Gama (M)	Classificação		
9	Equol	531-95-3	*Ligante*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligante	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligante	Fitoestrogénio Metabolito	Produto natural
10	Butilparabeno (4-hidroxibenzoato de *n*–butilo)	94-26-8	*Ligante*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligante	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligante	Parabeno	Conservante
11	Nonilfenol (mistura)	84852-15-3	*Ligante*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligante	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligante	Alquilfenol	Composto intermédio
12	*o,p'*-DDT	789-02-6	*Ligante*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligante	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligante	Organoclorado	Inseticida
13	Corticosterona	50-22-6	*Não ligante* (*)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Não ligante	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Não ligante	Esteroide	Produto natural
14	Zearalenona	17924-92-4	*Ligante*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligante	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligante	Hidrocarboneto heterocíclico, lactona	Produto natural
15	Tamoxifeno	10540-29-1	*Ligante*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligante	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligante	Hidrocarboneto cíclico	Produto farmacêutico, agente veterinário
16	5α-Di-hidrotestosterona	521-18-6	*Ligante*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligante	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligante	Esteroide não fenólico	Produto natural
17	Bisfenol A	80-05-7	*Ligante*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligante	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligante	Fenol	Produto químico intermédio
18	4-*n*-Heptilfenol	1987-50-4	*Ligante*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Equívoco (a)	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligante	Alquilfenol	Intermédio

▼M8

	Denominação da substância	N.º CAS	Resposta esperada	Ensaio de FW		Ensaio do CERI		Produto químico MESH Classe	Classe de produto
				Concentração Gama (M)	Classificação	Concentração Gama (M)	Classificação		
19	Kepone (Clordecona)	143-50-0	*Ligante*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligante	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligante	Hidrocarboneto halogenado	Pesticida
20	Benzo(a)antraceno	56-55-3	*Não ligante*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Não ligante ([b])	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Não ligante ([b])	Hidrocarboneto aromático	Intermédio
21	Enterolactona	78473-71-9	*Ligante*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligante	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Ligante	Fitoestrogénio	Produto natural
22	Progesterona	57-83-0	*Não ligante* (*)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Não ligante	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Não ligante	Esteroide	Produto natural
23	Octiltrietoxissilano	2943-75-1	*Não ligante*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Não ligante	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Não ligante	Silano	Modificador de superfície
24	Atrazina	1912-24-9	*Não ligante* (*)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Não ligante	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Não ligante	Composto heterocíclico	Herbicida

(*) Limite de solubilidade $< 1 \times 10^{-4}$ M.

(**) A utilização e classificação de ftalato de di-*n*-butilo (DBP) como não ligante baseou-se em ensaios até 10^{-4} M, porque se observou, em alguns laboratórios, durante os estudos de pré-validação, que a substância é insolúvel a 10^{-3} M (por exemplo, turbidez).

([†]) Durante o estudo de validação, o ftalato de di-*n*-butilo (DBP) foi ensaiado como uma substância codificada em concentrações até 10^{-3}M. Nestas condições, alguns laboratórios observaram uma diminuição da capacidade de ligação do ligando radioativo na concentração mais elevada (10^{-3}M) e/ou uma curva ambígua. Para estas séries, o DBP foi classificado como «inconclusivo» ou «ligante» em 3/5 laboratórios, com o ensaio do CERIT e em 5/ /6 laboratórios com o ensaio de FW (ver referência bibliográfica (2), secções IV.B.3a, b e VI.A).

([a]) A classificação não era compatível com a classificação esperada. A classificação do 4-*n*-heptilfenol como «inconclusivo» ou «não ligante» por 3/5 laboratórios, resultou numa classificação média de «inconclusivo». Uma inspeção mais atenta revelou que tal se deveu a limitações de solubilidade do produto químico que impediram a produção de uma curva de ligantes inteira.

([b]) Durante o estudo de validação, o benz(a)antraceno foi reclassificado como «não ligante» (ou seja, negativo), com base na literatura que demonstra que a atividade estrogênica *in vitro* relatada para esta substância (16) depende essencialmente da sua ativação metabólica (17)(18). Não era previsível a ativação metabólica enzimática da substância nos ensaios de ligação acelulares utilizados neste estudo de validação interlaboratorial. Assim, a classificação correta para esta substância é «não ligante» quando é utilizado nas condições experimentais dos ensaios de FW e do CERI.

▼M8

COMPONENTES DO ENSAIO DE FIXAÇÃO HRER

Componentes de ensaio essenciais

14. O presente método de ensaio aplica-se a ensaios que utilizam um recetor ER e um ligando suficientemente forte ao recetor, que pode ser utilizado como marcador/rastreador para o ensaio e pode ser deslocado com concentrações crescentes de um produto químico em estudo. Os ensaios de ligação contêm os dois componentes principais seguintes: 1) ligantes por saturação; 2) ligantes competitivos. O ensaio de saturação é utilizado para confirmar a especificidade e a atividade das preparações do recetor, enquanto a experiência de ligantes competitivos é utilizada para avaliar a capacidade de um produto químico para se fixar ao hrER.

Controlos

15. Deve ser descrever-se a base dos estrogénios e dos controlos de referência paralelos propostos. Os controlos paralelos [de solvente (veículo), positivos (ER, ligante, afinidade forte e fraca), negativo (não ligante)], consoante o caso, servem como indicação de que o ensaio está a progredir em condições adequadas e fornecem uma base para comparações entre experiências; geralmente, fazem parte dos critérios de aceitabilidade de uma experiência (1). As curvas de concentração inteiras para os estrogénios e os controlos de referência (por exemplo, ligante fraco e não ligante) devem ser utilizadas numa única placa em cada série de ensaios. Todas as outras placas devem conter: 1) uma concentração elevada (aproximadamente o deslocamento total do ligando com marcação radioativa) e média (aproximadamente IC_{50}), cada um dos E2 e do ligante fraco em triplicado; 2) controlo do solvente e ligante não específico, ambos em triplicado.

Procedimentos normalizados de controlo de qualidade

16. Devem ser aplicados os procedimentos normalizados de controlo da qualidade descritos para cada ensaio, a fim de garantir recetores ativos, concentrações corretas de produtos químicos, estabilidade dos limites de segurança ao longo de múltiplas replicações e manutenção da capacidade de fornecer as respostas ER-ligante esperadas ao longo do tempo.

Demonstração da competência técnica do laboratório

17. Antes de ensaiarem produtos químicos desconhecidos com qualquer dos ensaios do presente método, os laboratórios devem demonstrar competência técnica na realização do ensaio através da realização de ensaios de saturação para confirmar a especificidade e a atividade de preparação do ER e ensaios de ligação competitivos com os estrogénios e os controlos de referência (ligante fraco e não ligante). O laboratório deve estabelecer uma base de dados históricos com resultados relativos aos estrogénios e aos controlos de referência gerados no decurso de 3-5 experiências independentes realizadas em dias diferentes. Estas experiências serão a base dos estrogénios e dos controlos de referência históricos do laboratório e serão utilizadas para avaliação parcial da aceitabilidade do ensaio para futuras séries.

18. A capacidade de resposta do sistema de ensaio será também confirmada através do ensaio das substâncias indicadas no quadro 2. A lista de substâncias para demonstração de competência técnica é um subconjunto das substâncias de referência constantes das normas de desempenho para os ensaios de ligação do ER (3). Estas substâncias estão disponíveis no comércio, representam as classes de produtos químicos geralmente associadas à atividade de ligantes do ER e apresentam uma gama de potência adequada e previsível para ligantes de ER (ou seja, de forte a fraco) e não ligantes (ou seja, negativo). Para cada substância de demonstração de competência técnica, as concentrações ensaiadas devem abranger o intervalo de variação indicado no quadro 2. Devem efetuar-se pelo menos três experiências relativamente a cada substância, e os resultados devem ser conformes com a atividade química esperada. Cada experiência deve ser realizada de forma independente (ou seja, com diluições frescas de recetores, produtos químicos e reagentes), com três replicados para cada concentração. A competência é demonstrada por uma classificação correta (positiva/negativa) de cada uma das substâncias. Os ensaios de demonstração da competência técnica devem ser realizados por todos os técnicos que aprendem a realizar os ensaios.

▼M8

Quadro 2

Lista de substância de controlo e de demonstração da competência técnica para ensaios de ligação competitivos do hrER (1)

N.º	Denominação da substância	N.º CAS (2)	Resposta prevista (3) (4)	Gama de concentrações de ensaio (M)	Classe química MeSH (5)	Classe de produtos (6)
Controlos (estrogénios de referência, ligante fraco, não ligante)						
1	17β-Estradiol	50-28-2	Ligante	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Esteroide	Produto farmacêutico, agente veterinário
2	Noretinodrel (ou) Norentinodrona	68-23-5 (ou) 68-22-4	Ligante	3×10^{-9} – 30×10^{-6}	Esteroide	Produto farmacêutico, agente veterinário
3	Octiltrietoxissilano	2943-75-1	Não ligante	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Silano	Modificador de superfície
Substâncias para a demonstração de competência técnica (6)						
4	Dietilestilbesterol	56-53-1	Ligante	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Hidrocarboneto cíclico, fenol	Produto farmacêutico, agente veterinário
5	17α-Etinilestradiol	57-63-6	Ligante	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Esteroide	Produto farmacêutico, agente veterinário
6	Meso-hexesterol	84-16-2	Ligante	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Hidrocarboneto cíclico, fenol	Produto farmacêutico, agente veterinário
7	Tamoxifeno	10540-29-1	Ligante	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Hidrocarboneto cíclico	Produto farmacêutico, agente veterinário
8	Genisteína	446-72-0	Ligante	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Composto heterocíclico, flavonoide	Produto natural
9	Bisfenol A	80-05-7	Ligante	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Fenol	Produto químico intermédio
10	Zearalenona	17924-92-4	Ligante	1×10^{-11} – 1×10^{-3}	Composto heterocíclico, lactona	Produto natural

▼M8

N.º	Denominação da substância	N.º CAS ([2])	Resposta prevista ([3]) ([4])	Gama de concentrações de ensaio (M)	Classe química MeSH ([5])	Classe de produtos ([6])
11	Butilparabeno	94-26-8	Ligante	1×10^{-11} – 1×10^{-3}	Ácido carboxílico, fenol	Conservante
12	Atrazina	1912-24-9	Não ligante	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Composto heterocíclico	Herbicida
13	Ftalato de di-*n*-butilo (DBP) ([7])	84-74-2	Não ligante ([8])	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Hidrocarboneto cíclico, éster	Plastificante, Produto químico intermédio
14	Corticosterona	50-22-6	Não ligante	1×10^{-11} – 1×10^{-4}	Esteroide	Produto natural

([1]) Se uma substância de demonstração de competência técnica deixar de estar comercialmente disponível, pode ser usada uma substância com a mesma classificação ligante, potência comparável e da mesma classe de produtos químicos.

([2]) Abreviaturas: N.º de registo CAS = Número de registo do Chemical Abstracts Service

([3]) Classificação como ligante ou não ligante do ERαC durante o estudo de validação dos ensaios de ligação de hrER de FW e do CERI (2).

([4]) A atividade de ligação do ER baseou-se em informações constantes do ICCVAM Background Review Documents (BRD) for ER Binding and TA test methods (31), bem como em dados empíricos e informações obtidas a partir de estudos incluídos nas referências bibliográficas publicados e analisados (10) (11) (12) (13) (14) (15).

([5]) As substâncias foram afetadas a uma ou várias classes de produtos químicos com recurso à U.S. National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH), uma classificação normalizada e internacionalmente reconhecida (disponível em: http://www.nlm.nih.gov/mesh).

([6]) As substâncias foram afetadas a uma ou várias classes químicas com recurso à U.S. National Library of Medicine's Hazardous Substances Database (disponível em: http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HDPB)

([7]) O DBP pode ser utilizado como não ligante de controlo alternativo ensaiado com uma concentração máxima de 10^{-4} M.

([8]) O limite de solubilidade desta substância é 10^{-4} M. A utilização e classificação do ftalato de di-*n*-butilo (DBP) como não ligante basearam-se em ensaios até 10^{-4} M, porque se observou, em alguns laboratórios, durante os estudos de pré-validação, que a substância é insolúvel a 10^{-3}M (por exemplo, turbidez).

▼M8

Ensaio de solubilidade e determinação da gama de concentrações de produtos químicos em estudo

19. Deve efetuar-se um ensaio preliminar para determinar o limite de solubilidade de cada produto químico em estudo e identificar a gama de concentrações adequadas a utilizar no ensaio. O limite de solubilidade de cada produto químico em estudo deve ser determinado inicialmente no solvente e confirmado em condições de ensaio. A concentração final estudada no ensaio não deve exceder 1 mM. O ensaio de determinação da gama de concentrações consiste num controlo de solvente, a par de oito diluições sequenciais, a partir da concentração máxima aceitável (por ex., 1 mM ou inferior, com base no limite de solubilidade), e da presença de turbidez ou precipitado percetível. As concentrações na segunda e na terceira experiência devem ser ajustadas na medida do necessário para caracterizar melhor a curva concentração-resposta.

Critérios de aceitabilidade dos ensaios

20. A aceitação ou rejeição de uma série de ensaios baseia-se na avaliação dos resultados obtidos para os estrogénios e controlos de referência utilizados para cada experiência. Em primeiro lugar, para a placa 1, as curvas de concentração inteiras para os controlos de referência de cada experiência devem cumprir as medidas de desempenho relativas aos parâmetros das curvas (p. ex., IC_{50} e curva de Hill), com base nos resultados relatados para os protocolos correspondentes relativos aos ensaios do CERI e ensaios de FW de (apêndices 2 e 3) e nos dados históricos de controlo do laboratório que realiza o ensaio. Todos os controlos (estrogénios de referência, ligante fraco e não ligante) devem ser corretamente classificados para cada experiência. Em segundo lugar, os controlos de todas as placas subsequentes têm de ser avaliados em termos de coerência com a placa 1. Deve utilizar-se uma gama de concentrações do produto químico em estudo suficiente para definir com clareza o topo da curva do ligante competitivo. A variabilidade dos replicados em cada concentração do produto químico em estudo, bem como entre os três ensaios independentes, deve ser razoável e cientificamente aceitável. A capacidade para efetuar o ensaio de forma consistente deve ser demonstrada através da constituição e da manutenção de uma base de dados histórica para os estrogénios de referência. Os desvios-padrão (DP) ou os coeficientes de variação (CV) para as médias dos estrogénios de referência e para os parâmetros das curvas do ligante fraco de controlo de várias experiências podem ser utilizados como indicadores da reprodutibilidade interna do laboratório. Devem utilizar-se critérios profissionais para a avaliação dos resultados do controlo das placas de cada série de ensaios, bem como para cada produto químico em estudo.

Além disso, devem ser respeitados os seguintes princípios relativos aos critérios de aceitabilidade:

— Os dados devem ser suficientes para uma avaliação quantitativa do ligante do ER,

— As concentrações ensaiadas devem manter-se dentro da gama de solubilidade dos produtos químicos em estudo.

Análise dos dados

21. O procedimento definido para a análise dos dados relativos aos ligantes por saturação e competitivo devem respeitar os princípios fundamentais da caracterização das interações recetor-ligando. Normalmente, os dados relativos aos ligantes por saturação são analisados por recurso a um modelo de regressão não linear que contabiliza a ligação total e não específica. Pode ser necessária uma correção por depleção de ligantes [ex. Swillens, 1995 (19)] aquando da determinação de $B_{máx}$ e Kd. Os dados provenientes de ensaios de ligação competitivos são geralmente *software* transformados [por exemplo, percentagem de ligação específica e concentração do produto químico em

▼M8

estudo (logM)]. Para cada produto químico em estudo, as estimativas de $\log(IC_{50})$ devem ser determinadas com recurso a um *software* de ajustamento de curva não linear adequado, a fim de a adaptar à equação de quatro parâmetros de Hill. Na sequência de uma análise preliminar, devem ser definidos os parâmetros de ajustamento da curva e realizada uma análise visual da forma como os dados do ligante se adaptam à curva de ligação competitiva gerada. Em alguns casos, pode ser necessária uma análise adicional para obter o melhor ajustamento da curva (por exemplo, restrição do topo e/ou da base da curva, utilização da regra dos 10 %, ver apêndice 4 e referência 2 (secção III.A.2).

22. O cumprimento dos critérios de aceitabilidade (ponto 20) indica que o ensaio está a funcionar corretamente, mas não garante que produz dados exatos. A replicação dos resultados corretos do primeiro ensaio constitui a melhor indicação de que foram produzidos dados exatos.

Critérios gerais de interpretação dos dados

23. Não existe na atualidade um método universalmente aceite para a interpretação dos dados de ligantes de ER. No entanto, tanto a avaliação qualitativa (por exemplo ligante/não ligante) como a quantitativa [p. ex., $\log(IC_{50})$, afinidade de ligação relativa (RBA), etc.] da atividade mediada pelo ER devem basear-se em dados empíricos e em pareceres científicos sólidos.

Relatório de ensaio

24. O relatório do ensaio deve incluir as seguintes informações:

Método de ensaio

— ensaio utilizado;

Controlo/referência/produto químico em estudo

— origem, número de lote e data-limite de utilização, se conhecida;

— estabilidade do produto químico em estudo, se conhecida;

— solubilidade e estabilidade do produto químico em estudo no solvente, se conhecida;

— medição do pH, da pressão osmótica e da quantidade de precipitado no meio de cultura ao qual foi adicionado o produto químico em estudo, consoante o que for adequado.

Substância monocomponente:

— aspeto físico, hidrossolubilidade e outras propriedades físico-químicas pertinentes;

— dados de identificação química, como as denominações IUPAC ou CAS, número CAS, código SMILES ou InChI, fórmula estrutural, pureza, identidade química de impurezas, caso se justifique e seja exequível, etc.

Substância multicomponentes, UVCB e misturas:

— caracterizada, na medida do possível, pela identidade química (ver acima), ocorrência quantitativa e principais propriedades físico-químicas dos componentes.

▼**M8**

Solvente/veículo:

— caracterização (natureza, fornecedor e lote);

— justificação para a escolha do solvente/veículo;

— solubilidade e estabilidade do produto químico em estudo no solvente/ /veículo, se conhecida;

Recetores:

— origem dos recetores (fornecedor, número de catálogo, lote, espécie do recetor, concentração ativa do recetor fornecido pelo fornecedor, certificação do fornecedor)

— caracterização de recetores (incluindo os resultados dos ligantes por saturação): Kd, $B_{máx}$,

— armazenamento dos recetores

— ligando com marcação radioativa:

— fornecedor, número de catálogo, lote, atividade específica

Condições de realização do ensaio:

— limitações da solubilidade nas condições de ensaio,

— composição do tampão do ligante;

— concentração do recetor;

— concentração do traçador (ou seja, ligante com marcação radioativa);

— concentrações do produto químico em estudo;

— percentagem do veículo no ensaio final;

— tempo e temperatura de incubação;

— método de separação agrupado/isolado;

— controlos positivos e negativos/substâncias de referência;

— critérios definidos para que os ensaios sejam considerados positivos, negativos ou inconclusivos,

Verificação da aceitabilidade:

— valores reais de IC_{50} e da curva de Hill para controlos positivos/substâncias de referência,

Resultados:

— dados brutos agrupados e isolados;

— controlo de confirmação da desnaturação, se for caso disso;

— se existir, a concentração mínima efetiva (LEC);

— valores RBA e/ou IC_{50}, consoante o caso;

— relação concentração-resposta, quando for possível determiná-la;

— análise estatística, se for caso disso, associada a uma medida de erro e confiança (por exemplo, SEM, DP, CV ou IC 95 %) e descrição da forma como os valores foram obtidos;

▼**M8**

Discussão dos resultados:

— aplicação da regra dos 10 %

Conclusão

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(1) OCDE (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(2) OCDE (2015). Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Recetor Alpha (hrERα), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 226), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(3) OCDE (2015). Performance Standards for Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Recetor Alpha (hrERα), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 222), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(4) OCDE (2012). Guidance Document on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 150), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(5) Cavailles V. (2002). Estrogens and Recetors: an Evolving Concept, Climacteric, 5 Suppl 2: p.20-6.

(6) Welboren W.J., *et al.* (2009). Genomic Actions of Estrogen Recetor Alpha: What are the Targets and How are they Regulated? *Endocr*. Relat. Cancer., 16(4): p. 1073-89.

(7) Younes M. and Honma N. (2011). Estrogen Recetor Beta, Arch. *Pathol*. Lab. Med., 135(1): p. 63-6.

(8) Diamanti-Kandarakis *et al.* (2009). Endocrine-Disrupting Chemicals: an Endocrine Society Sci. Statement, Endo Rev 30(4):293-342.

(9) ICCVAM (2002). Background Review Document. Current Status of Test Methods for Detecting Endocrine Disruptors: *In Vitro* Estrogen Recetor Binding Assays. (NIH Publication No 03-4504). National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC.

(10) ICCVAM (2003). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Recetor and Androgen Recetor Binding and Transcriptional Activation Assays.

(11) ICCVAM (2006). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Recetor and Androgen Recetor Binding and Transcriptional Activation Assays.

(12) Akahori Y. *et al.* (2008). Relationship Between the Results of *In Vitro* Recetor Binding Assay to Human Estrogen Recetor Alpha and *In Vivo* Uterotrophic Assay: Comparative Study with 65 Selected Chemicals, *Toxicol*. *In Vitro*, 22(1): 225-231.

(13) OCDE (2007). Additional Data Supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in Rodents, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 67), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

▼**M8**

(14) Takeyoshi, M. (2006). Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity - The Human Estrogen Recetor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line, Chemicals Evaluation and Research Institute (CERI): Japan. p. 1-188.

(15) Yamasaki, K; Noda, S; Imatanaka, N; Yakabe, Y. (2004). Comparative Study of the Uterotrophic Potency of 14 Chemicals in a Uterotrophic Assay and their Recetor-Binding Affinity, Toxicol. Letters, 146: 111--120.

(16) Kummer V; Maskova, J; Zraly, Z; Neca, J; Simeckova, P; Vondracek, J; Machala, M. (2008). Estrogenic Activity of Environmental Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Uterus of Immature Wistar Rats. *Toxicol.* Letters, 180: 213-221.

(17) Gozgit, JM; Nestor, KM; Fasco, MJ; Pentecost, BT; Arcaro, KF. (2004). Differential Action of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Endogenous Estrogen-Responsive Genes and on a Transfected Estrogen-Responsive Reporter in MCF-7 Cells. *Toxicol. and Applied Pharmacol*., 196: 58-67.

(18) Santodonato, J. (1997). Review of the Estrogenic and Antiestrogenic Activity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Relationship to Carcinogenicity. Chemosphere, 34: 835-848.

(19) Swillens S (1995). Interpretation of Binding Curves Obtained with High Recetor Concentrations: Practical Aid for Computer Analysis, Mol Pharmacol 47(6):1197-1203.

▼**M8**

Apêndice 1

DEFINIÇÕES E ABREVIATURAS

Adequação: descrição da relação de um ensaio com o objeto de interesse e da sua importância e utilidade para um determinado fim. Traduz a medida em que o ensaio mede ou prevê corretamente o efeito biológico em causa. A adequação comporta a exatidão (concordância) de um ensaio (1).

Atividade estrogénica: capacidade de um produto químico reproduzir o 17β--estradiol na sua capacidade de ligação a recetores de estrogénios. O presente método de ensaio permite detetar a ligação ao hERα.

CF: quadro conceptual da OCDE para ensaio e avaliação de perturbadores do sistema endócrino.

Competência técnica: capacidade comprovada para efetuar um ensaio de forma adequada antes de ensaiar substâncias desconhecidas.

Critérios de aceitabilidade: normas mínimas para a realização de controlos experimentais e padrões de referência. Para que uma experiência seja considerada válida, devem ser satisfeitos todos os critérios de aceitabilidade.

CV: coeficiente de variação.

DP: desvio-padrão.

E2: 17β-estradiol.

ED: desregulação do sistema endócrino.

Ensaio «me-too»: expressão coloquial para designar um método que é, estrutural e funcionalmente, semelhante a um método de ensaio de referência validado e aceite. O termo é sinónimo de «método de ensaio similar».

ER: Recetor de estrogénio.

Estrogénio de referência: 17ß-estradiol (E2, CAS 50-28-2).

Exatidão (concordância): grau de concordância entre os resultados do ensaio e um valor de referência aceite. Constitui uma medida da eficiência do método e um aspeto da adequação. Este termo e o termo «concordância» são muitas vezes utilizados indistintamente para indicar uma proporção de resultados corretos do método de ensaio (1).

Fiabilidade: indica em que medida um ensaio pode ser reproduzido ao longo do tempo num mesmo laboratório e entre laboratórios utilizando o mesmo protocolo. A fiabilidade é avaliada com base nos valores calculados das reprodutibilidades intralaboratorial e interlaboratorial.

hERα: recetor alfa de estrogénio humano.

IC_{50}: concentração semimáxima efetiva de um produto químico em estudo inibidor.

▼M8

ICCVAM: Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods [Comissão de Coordenação da Validação de Métodos Alternativos].

LEC: menor concentração eficaz é a menor concentração do produto químico em estudo que produz uma resposta (ou seja, a menor concentração do produto químico em estudo em que o fator de indução é estatisticamente diferente do controlo do veículo concorrente).

Método de ensaio validado: método de ensaio relativamente ao qual foram realizados estudos de validação com vista a determinar a sua adequação (incluindo a exatidão) e fiabilidade para um determinado fim. Importa referir que um método de ensaio validado pode não ser suficientemente exato e fiável para ser considerado aceitável para o fim pretendido (1).

Métodos de ensaio de referência: ensaios em que se baseia o PBTG 493.

Normas de desempenho: normas, associadas a um método de ensaio validado, com base nas quais pode ser avaliada a comparabilidade de um ensaio proposto que seja mecanística e funcionalmente similar. Incluem: (1) componentes essenciais do método de ensaio; (2) uma lista mínima de produtos químicos de referência, escolhidos de entre os produtos químicos utilizados para demonstrar o desempenho aceitável do método de ensaio validado; e (3) níveis de exatidão e fiabilidade comparáveis, baseados no que foi obtido para o método de ensaio validado, que o método de ensaio proposto deve demonstrar quando avaliado pela utilização da lista mínima de produtos químicos de referência (1).

PBTG: diretriz de ensaio baseada no desempenho.

Produto químico: uma substância ou mistura.

Produto químico em estudo: qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado o presente método de ensaio.

RBA: afinidade de ligação relativa. A RBA de uma substância é calculada como uma percentagem do $\log(IC_{50})$ para a substância relativamente ao $\log(IC_{50})$ para o 17β-estradiol.

Regra dos 10 %: opção de excluir da análise dados em que a média dos replicados para a percentagem de ligação específica do [^{3}H]17β-estradiol tenha superior em 10 % ou mais à observada para o valor médio a uma concentração inferior (ver apêndice 4).

Reprodutibilidade interlaboratorial: uma medida do grau em que diferentes laboratórios qualificados que utilizam o mesmo protocolo e testam as mesmas substâncias podem produzir resultados qualitativa e quantitativamente similares. A reprodutibilidade interlaboratorial é determinada durante os processos de pré-validação e validação e indica em que medida um método pode ser transferido com êxito entre laboratórios, igualmente designada «reprodutibilidade entre laboratórios» (1).

Reprodutibilidade intralaboratorial: uma medida do grau em que pessoal qualificado do mesmo laboratório consegue replicar resultados com êxito utilizando o mesmo protocolo, em momentos diferentes. Igualmente designada «reprodutibilidade intralaboratorial» (1).

Substâncias para a demonstração de competência técnica: um subconjunto das substâncias de referência incluídas nas normas de desempenho que pode ser utilizado pelos laboratórios para demonstrar competência técnica com um ensaio normalizado. Os critérios de seleção destas substâncias incluem normalmente o facto de representarem a gama de respostas, estarem comercialmente disponíveis e disporem de dados de referência de elevada qualidade.

Validação: o processo de estabelecimento da fiabilidade e adequação de uma determinada abordagem, método, processo ou avaliação para um determinado fim (1).

▼**M8**

Apêndice 2

ENSAIOS IN VITRO DE LIGAÇÃO POR SATURAÇÃO E COMPETITIVA AO RECETOR DE ESTROGÉNIO (ERA) COM RECURSO A ERA RECOMBINANTE INTEIRO DE FREYBERGER-WILSON

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES (VER TAMBÉM INTRODUÇÃO GERAL)

1. Este ensaio *in vitro* de ligação por saturação e competitiva ao recetor de estrogénio (ER) utiliza o recetor humano inteiro ERαα(hrERα), que é produzido em células de insetos infetadas com baculovírus e destas isolado. O protocolo, desenvolvido por Freiberger e Wilson, foi submetido a um estudo de validação internacional em vários laboratórios (2), que demonstrou a sua pertinência e fiabilidade para o fim a que se destina.

2. Este ensaio é um procedimento de análise para identificação de substâncias suscetíveis de se ligarem a toda a extensão do hrERα. É utilizado para determinar a capacidade de um produto químico em estudo para competir com o 17β-estradiol pela ligação ao hrERα. Os resultados quantitativos do ensaio podem incluir o IC_{50} (uma medição da concentração do produto químico em estudo necessária para deslocar metade do [^{3}H]17β-estradiol do hrERα) e as afinidades de ligação relativas dos produtos químicos em estudo para o hrERα em comparação com o 17β-estradiol. Para fins de análise química, os resultados qualitativos de ensaios aceitáveis podem incluir classificações produtos químicos em estudo como ligantes ou não ligantes do hrERα, ou como inconclusivos com base nos critérios descritos para as curvas de ligação.

3. O ensaio utiliza ligandos radioativos, sendo necessário que o laboratório disponha de uma licença para o manuseamento desses materiais. Todos os procedimentos com radioisótopos e produtos químicos perigosos devem seguir a regulamentação e os procedimentos previstos na legislação nacional.

4. As secções «**INTRODUÇÃO GERAL**» e «**COMPONENTES DO ENSAIO DE LIGAÇÃO DO hrER**» devem ser lidas antes da utilização do presente ensaio para fins normativos. As definições e abreviaturas utilizadas são descritas no apêndice 1.

PRINCÍPIOS DO ENSAIO (VER TAMBÉM INTRODUÇÃO GERAL)

5. O ensaio de ligação ao hrERα mede a capacidade de um ligando com marcação radioativa – [^{3}H]17β-estradiol – para se ligar ao ER na presença de concentrações crescentes de um produto químico em estudo (concorrente). Os produtos químicos em estudo que possuem uma elevada afinidade para o ER competem com o ligando com marcação radioativa a uma concentração mais baixa comparativamente com os produtos químicos com menor afinidade para o recetor.

6. O presente ensaio é composto por dois componentes principais: uma experiência de ligantes por saturação com vista a caracterizar os parâmetros da interação recetor-ligando, seguida de uma experiência de ligantes competitivos que caracteriza a concorrência entre um produto químico em estudo e um ligando com marcação radioativa para ligação ao ER.

7. O objetivo da experiência de ligação por saturação é caracterizar um determinado lote de recetores para afinidade de ligação e número de recetores em preparação para a realização da experiência de ligação competitiva. A experiência de ligação por saturação mede, em condições de equilíbrio, a afinidade de uma concentração fixa do recetor de estrogénio com o seu ligando natural (representado pela constante de dissociação, Kd) e a concentração de pontos de recetores ativos ($B_{máx}$).

▼M8

8. A experiência de ligação competitiva mede a afinidade de uma substância para competir com o [^{3}H]17β-estradiol pela ligação ao ER. A afinidade é quantificada pela concentração do produto químico em estudo que, em equilíbrio, inibe 50 % do ligante específico do [^{3}H]17β-estradiol (designada «concentração inibidora 50 %» ou «IC_{50}»). A afinidade pode igualmente ser avaliada através da afinidade de ligação relativa (RBA, em relação à IC_{50} do estradiol, medida separadamente na mesma série de ensaios). A experiência de ligação competitiva mede a ligação do [^{3}H]17β-estradiol a uma concentração fixa na presença de uma vasta gama de concentrações (oito ordens de grandeza) do produto químico em estudo. Os dados são, então, ajustados, na medida do possível, a uma forma da equação de Hill (Hill, 1910) que descreve o deslocamento do ligando radioativo através de um ligante concorrente num ponto. A extensão da deslocação do estradiol com marcação radioativa em equilíbrio é utilizada para caracterizar o produto químico em estudo como ligante, não ligante ou inconclusivo.

PROCEDIMENTO

Demonstração do desempenho proteico aceitável do hrERα

9. Antes de realizar rotineiramente os ensaios de ligação por saturação e de ligação competitiva, deve verificar-se se cada novo lote de hrERα tem um desempenho correto no laboratório em que será usado. Para demonstrar esse desempenho, deve utilizar-se um processo em duas etapas:

— Realização de um ensaio de ligação por saturação [^{3}H]17β-estradiol para demonstrar a especificidade e a saturação do hrERα. A análise de regressão não linear dos dados (por exemplo, BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) e a subsequente aplicação da equação de Scatchard devem comprovar a afinidade de ligação do hrERα com o [^{3}H]17β-estradiol (Kd) e o número de recetores ($B_{máx}$) de cada lote de hrERα.

— Realizar um ensaio de ligação competitiva com recurso às substâncias de controlo [estrogénio de referência (17β-estradiol], um ligante fraco (por exemplo, noretinodrel ou norentinodrona), e um não ligante (octiltrietoxissilano, OTES). Cada laboratório deve estabelecer uma base de dados histórica para documentar a coerência do IC_{50} e outros valores relevantes para os estrogénios de referência e de um ligante fraco, entre as experiências e os diferentes lotes de hrERα. Os parâmetros das curvas de ligação competitiva para as substâncias de controlo devem situar-se dentro dos limites do intervalo de confiança de 95 % (ver quadro 1) que foram estabelecidos com recurso a dados de laboratórios que participaram no estudo de validação deste ensaio (2).

Quadro 1

Critérios de desempenho estabelecidos para os estrogénios de referência e para o ligante fraco, ensaio de ligação de hrER de FW

Substância	Parâmetro	Média [a]	Desvio-padrão (n)	Intervalos de confiança de 95 % [b]	
				Limite inferior	Limite superior
17β-Estradiol	Topo (%)	100,44	10,84 (67)	97,8	103,1
	Base (%)	0,29	1,25 (67)	-0,01	0,60
	Curva de Hill	-1,06	0,20 (67)	-1,11	-1,02
	log(IC_{50}) (M)	-8,92 ()	0,18 (67)	-8,97	-8,88

▼M8

Substância	Parâmetro	Média [a]	Desvio-padrão (n)	Intervalos de confiança de 95 % [b]	
				Limite inferior	Limite superior
Noretinodrel	Topo (%)	99,42	8,90 (68)	97,27	101,60
	Base (%)	2,02	3,42 (68)	1,19	2,84
	Curva de Hill	-1,01	0,38 (68)	-1,10	-0,92
	$\log(IC_{50})$ (M)	-6,39	0,27 (68)	-6,46	-6,33
Noretinedrona [c]	Topo (%)	96,14	8,44 (27)	92,80	99,48
	Base (%)	2,38	5,02 (27)	0,40	4,37
	Curva de Hill	-1,41	0,32 (27)	-1,53	-1,28
	$\log(IC_{50})$ (M)	-5,73	0,27 (27)	-5,84	-5,62

([a]) A média (n) ± desvio-padrão (DP) foram calculados utilizando estimativas de parâmetros de ajustamento da curva (4 parâmetros da equação de Hill) para séries de ensaios de controlo realizadas em quatro laboratórios durante o estudo de validação(ver anexo N da referência bibliográfica 2).

([b]) Os intervalos de confiança de 95 % são fornecidos como orientação para os critérios de aceitabilidade.

([c]) O ensaio de noretindrona era facultativo para subtarefa 4 durante o estudo de validação (ver referência bibliográfica 2, ver «Subtarefa 4»). Por conseguinte, a média ± DP (n) foi calculada utilizando estimativas ajustadas da curva (equação de 4 parâmetros de Hill) para séries de ensaios de controlo realizadas em dois laboratórios.
A gama do IC_{50} depende do Kd da preparação do recetor e da concentração de ligando com marcação radioativa utilizada em cada laboratório. Admite-se um ajustamento adequado da gama do IC_{50} com base nas condições de realização do ensaio.

Demonstração da competência técnica do laboratório

10. Ver os pontos 17 e 18 e o quadro 2 da secção «**COMPONENTES DA ENSAIO DE LIGAÇÃO DO hrER**» do presente método de ensaio. Cada ensaio (ligação por saturação e ligação competitiva) deve ser constituído por três séries de ensaios independentes (ou seja, diluições de recetor, produtos químicos e reagentes) em dias diferentes, devendo cada série conter três replicados.

Determinação do da concentração do recetor (hrERα)

11. A concentração do recetor ativo varia ligeiramente em função do lote e das condições de armazenagem. Por esta razão, deve determinar-se a concentração do recetor ativo recebida do fornecedor. Obtém-se assim a concentração adequada do recetor ativo no momento da série de ensaios.

12. Em condições correspondentes à ligação competitiva (1 nM [^{3}H]-estradiol), as concentrações nominais de recetor de 0,25, 0,5, 0,75 e 1 nM devem ser incubadas na ausência (ligação total) e na presença (ligação não específica) de 1 μM de estradiol não marcado. À ligação específica, calculada como a diferença entre a ligação total e a ligação não específica, faz-se corresponder a concentração nominal do recetor. A concentração do recetor que der valores de ligação específicos correspondentes a 20 % da marcação radioativa adicionada está relacionada com a concentração nominal de recetor correspondente, devendo esta ser utilizada para as experiências de saturação e de ligação competitiva. Frequentemente, uma concentração final de hrER de 0,5 nM satisfaz esta condição.

▼M8

13. Se o critério dos 20 % não puder, repetidamente, ser satisfeito, importa verificar o procedimento experimental para deteção de eventuais erros. O incumprimento do critério dos 20 % pode indicar que há muito pouco recetor ativo no lote recombinante, caso em que se deve ponderar a utilização de outro lote de recetores.

Ensaio de saturação

14. Devem ser avaliadas em triplicado oito concentrações crescentes de [^{3}H]17β--estradiol, nas três condições seguintes (ver quadro 2):

— Ausência de 17β-estradiol não marcado e presença de ER. Trata-se de determinar a ligação total por medida da radioatividade nos poços que apenas têm [^{3}H]17β-estradiol.

— Presença de uma concentração excessiva (1 000 vezes mais) de β-estradiol não marcado em relação ao 17β-estradiol marcado e presença de ER. O objetivo desta condição é saturar os pontos de ligação ativos com 17β--estradiol não marcado e, mediante a medição da radioatividade nos poços, determinar a ligação não específica. Qualquer estradiol quente remanescente que possa ligar-se ao recetor é considerado ligante a um ponto não específico, dado que o estradiol frio deve estar numa concentração tão elevada que se liga a todos os pontos disponíveis no recetor.

— Ausência de 17β-estradiol não marcado e ausência de ER (determinação da radioatividade total)

Preparação de soluções de [^{3}H]17β-estradiol e de 17β-estradiol não marcado

15. As diluições de [^{3}H]17β-estradiol devem ser preparadas por adição de tampão de ensaio a uma solução-mãe de [^{3}H]17β-estradiol 12 nM para obter concentrações inicialmente compreendidas entre 0,12 nM e 12 nM. Adicionando 40 µl destas soluções aos respetivos poços de uma placa de microtitulação com 96 poços (para um volume final de 160 µl), obtêm-se concentrações finais compreendidas entre 0,03 e 3,0 nM. A preparação do tampão de ensaio, da solução e diluições de [^{3}H]17β-estradiol e a determinação das concentrações são descritas em pormenor no protocolo de FW (2).

16. As diluições de soluções de β-estradiol devem ser preparadas por adição de tampão de ensaio, a fim de se obter oito concentrações crescentes, compreendidas, inicialmente, entre 0,06 µM e 6 µM. Adicionando 80 µl destas soluções aos respetivos poços de uma placa de microtitulação com 96 poços (para um volume final de 160 µl), obtêm-se as concentrações finais do ensaio, compreendidas entre 0,03 µM e 3 µM. A concentração final do 17β-estradiol não marcado nos poços individuais não específicos deve corresponder a 1 000 vezes a concentração do [3H]17β-estradiol não marcado. A preparação das diluições não marcadas de 17β-estradiol é descrita em pormenor no protocolo de FW (2).

17. Deve usar-se a concentração nominal do recetor que dê uma ligação específica de 20±5 % (ver os pontos 12 a 13). A solução de hrERIα deve ser preparada imediatamente antes de ser utilizada.

18. As placas de microtitulação de 96 poços são preparadas de acordo com o quadro 2, com 3 replicados por concentração. O apêndice 2.2 apresenta exemplos de concentrações da placa e distribuição de volumes do [^{3}H]17β-estradiol, 17β-estradiol não marcado, tampão e recetor.

▼M8

Quadro 2

Configuração da placa de microtitulação no ensaio de ligação por saturação

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,03 nM [^{3}H] E2 + ER			0,06 nM [^{3}H] E2 + ER			0,08 nM [^{3}H] E2 + ER			0,10 nM [^{3}H] E2 + ER			Ligante total (solvente)
B	0,30 nM [^{3}H] E2 + ER			0,60 nM [^{3}H] E2 + ER			1,0 nM [^{3}H] E2 + ER			3,0 nM [^{3}H] E2 + ER			
C													
D	0,03 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,03 μM E2			0,06 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,06 μM E2			0,08 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,08 μM E2			0,10 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,10 μM E2			Ligante não específico
E	0,30 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,30 μM E2			0,60 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,60 μM E2			1,0 nM [^{3}H] E2 + ER + 1,0 μM E2			3,0 nM [^{3}H] E2 + ER + 3,0 μM E2			
F													
G													
H													

[^{3}H] E2: [^{3}H]17β-estradiol
ER: recetor de estrogénio
E2: 17β-estradiol não marcado

19. As placas de microtitulação devem ser incubadas a 2-8^o C, durante 16-20 horas, e colocadas num mecanismo de rotação durante o período de incubação.

Medição de [^{3}H]17β-estradiol ligado à hrERα

20. O [^{3}H]17β-estradiol ligado ao hrERα deve ser separado do [^{3}H]17β-estradiol livre por adição de 80 μl de suspensão de DCC fria a cada poço, agitando as placas de microtitulação durante 10 minutos e centrifugando-as, durante 10 minutos, a cerca de 2 500 rpm. Para minimizar a dissociação de [^{3}H]17β--estradiol ligado ao hrERα durante este processo, é extremamente importante que os tampões e os poços sejam mantidos a 2-8 °C e que cada etapa seja realizada rapidamente. Para utilizar as placas de microtitulação de forma eficiente e rápida, é necessário um agitador.

21. Para evitar qualquer contaminação dos poços por contacto com o DCC, devem retirar-se com extremo cuidado 50 μl do sobrenadante contendo [^{3}H]17β-estradiol ligado ao hrERα.

22. Adicionam-se então a cada poço 200 μl de fluido de cintilação, capaz de converter a energia cinética das emissões nucleares em energia luminosa (A1-B12 e D1-E12). Os poços G1-H12 (identificados como dpms total) representam diluições sequenciais do [^{3}H]17β-estradiol (40 μl),) que devem ser adicionadas diretamente ao líquido de cintilação nos poços da placa de medição conforme indicado no quadro 3; assim, esses poços contêm apenas 200 μl de líquido de cintilação e a diluição adequada do [3H]17β-estradiol. Estas medidas demonstram quanto [^{3}H]17β-estradiol foi adicionado a cada conjunto de poços para a ligação total e para a ligação não específica.

▼M8

Quadro 3

Configuração da placa de microtitulação no ensaio de ligação por saturação Medição da radioatividade

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,03 nM [^{3}H] E2 + ER			0,06 nM [^{3}H] E2 + ER			0,08 nM [^{3}H] E2 + ER			0,10 nM [^{3}H] E2 + ER			Ligante total (solvente)
B	0,30 nM [^{3}H] E2 + ER			0,60 nM [3H] E2 + ER			1,0 nM [^{3}H] E2 + ER			3,0 nM [^{3}H] E2 + ER			
C													
D	0,03 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,03 µM E2			0,06 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,06 µM E2			0,08 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,08 µM E2			0,10 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,10 µM E2			Ligante não específico
E	0,30 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,30 µM E2			0,60 nM [^{3}H] E2 + ER + 0,60 µM E2			1,0 nM [^{3}H] E2+ ER + 1,0 µM E2			3,0 nM [^{3}H] E2 + ER + 3,0 µM E2			
F													
G	0,03 nM [^{3}H] E2 (dpms total)			0,06 nM [^{3}H] E2			0,08 nM [^{3}H] E2			0,10 nM [^{3}H] E2			Dpms total (*)
H	0,30 nM [^{3}H] E2			0,60 nM [^{3}H] E2			1,0 nM [^{3}H] E2			3,0 nM [^{3}H] E2			

[^{3}H] E2: [^{3}H]17β-estradiol

ER: recetor de estrogénio

E2: 17β-estradiol não marcado

Dpms: desintegrações por minuto

(*) As diluições sequenciais a quente de [^{3}H]-estradiol marcado devem ser diretamente adicionadas em 200 µl de fluido de cintilação nos poços G1 – H12.

23. As medições devem iniciar-se com um desfasamento de, pelo menos, 2 horas, devendo o tempo de contagem ser de 40 minutos por poço. Para a determinação de dpm/poço, com correção do efeito de atenuação, deve utilizar-se um contador de cintilação em placas de microtitulação. Em alternativa, se não se dispuser de um contador de cintilação deste tipo, as amostras podem ser medidas num contador convencional. Nestas condições, pode ponderar-se uma redução do tempo de contagem.

Ensaio de ligação competitiva

24. O ensaio de ligação competitiva mede a ligação de uma única concentração de [^{3}H17β-estradiol na presença de concentrações crescentes de um produto químico em estudo. Devem utilizar-se três replicados paralelos de cada concentração numa mesma série de ensaios. Além disso, devem efetuar-se três ensaios não paralelos para cada produto químico ensaiado. O ensaio deve utilizar uma ou mais placas de microtitulação de 96 poços.

Controlos

25. experiência do ensaio deve incluir o solvente e os controlos paralelos (isto é, estrogénios de referência, ligante fraco e não ligante). As curvas de concentração inteiras para os estrogénios e os controlos de referência (por exemplo, ligante fraco e não ligante) devem corresponder a uma única placa em cada série de ensaios. Todas as outras placas devem conter: i) uma concentração elevada (deslocamento máximo) e média (aproximadamente a IC_{50}) de cada um dos E2 e ligante fraco em triplicado; ii) controlo do solvente e ligação não específica, cada um, no mínimo, em triplicado. Os procedimentos para a preparação das soluções-tampão de ensaio, controlos, [^{3}H]17β-estradiol, hrERα e produtos químicos em estudo estão descritos na referência bibliográfica 2 (anexo K, ver «FW Assay Protocol»).

▼M8

Controlo do solvente

26. O controlo do solvente indica que este não interage com o sistema de ensaio e mede a ligação total (TB). O etanol é o solvente preferencial. Em alternativa, se a concentração mais elevada do produto químico em estudo não for solúvel em etanol, pode utilizar-se DMSO. A concentração de etanol – ou DMSO, se for o caso – nos poços do ensaio final é de 1,5 %, não podendo exceder 2 %.

Controlo do tampão

27. O controlo do tampão (BC) não deve conter solvente nem produto químico em estudo, mas conter todos os outros componentes do ensaio. Os resultados do controlo do tampão são comparados com o controlo do solvente, para verificar se o solvente utilizado não afeta o sistema de ensaio.

Ligante forte (estrogénio de referência)

28. O 17β-estradiol (n.º CAS 50-28-2) é o ligando endógeno e liga-se com elevada afinidade ao ER de subtipo alfa. Deve preparar-se uma curva padrão com 17β-estradiol não marcado para cada ensaio de ligação competitiva do hrERα, a fim de se proceder a uma avaliação da variabilidade entre ensaios realizados no mesmo laboratório. Devem preparar-se, em etanol, oito soluções de 17β-estradiol não marcado, com concentrações nos poços compreendidas entre 100 nM e 10 PM -7[logM] a -11[logM]), espaçadas do seguinte modo: (-7[logM], -8[logM], -8,5[logM], -9[logM], - 9.5[logM], -10[logM], -11[logM]). A maior concentração de 17β-estradiol (1 μM) não marcado serve também de indicador de ligação inespecífica. Esta concentração distingue-se pelo rótulo «NSB» no quadro 4, embora também faça parte da curva-padrão.

Ligante fraco

29. Para demonstrar a sensibilidade de cada experiência e permitir uma avaliação da variabilidade ao longo do tempo, deve ser incluído um ligante fraco [noretinodrel (n.º CAS 68-23-5) ou noretinodrona (n.º CAS 68-22-4)]. Devem preparar-se, em etanol, oito soluções de ligante fraco, com concentrações nos poços compreendidas entre 3 nM e 30 μM (-8,5[logM] to -4,5[logM]), espaçadas do seguinte modo: -4,5[logM], -5[logM], -5,5[logM], -6[logM], -6,5[logM], -7[logM],-7,5[logM], -8,5[logM].

Não ligante

30. Deve ser usado octiltrietoxissilano (OTES, n.º CAS 2 943-75-1) como controlo negativo (não ligante), que garante que o ensaio permite detetar os produtos químicos em estudo que não se ligam ao hrERα. Devem preparar-se em etanol oito soluções do não ligante, com concentrações nos poços do ensaio compreendidas entre 0,1 nM e 1 000 μM (-10[logM] a -3[logM]) e escalonadas. Pode utilizar-se ftalato de di-*n*-butilo (DBP), como não ligante de controlo alternativo. A sua solubilidade máxima demonstrada é de -4 [logM].

Concentração de hrERα

31. Deve utilizar-se a quantidade de recetor que dá um valor específico de ligação de 20±5 % de 1 nM de ligando radioativo (ver pontos 12-13 do apêndice 2). A solução de hrERIα deve ser preparada imediatamente antes de ser utilizada.

[^{3}H]17β-estradiol

32. A concentração de [^{3}H]17β-estradiol nos poços deve ser de 1,0 nM.

▼M8

Produtos químicos em estudo

33. Em primeiro lugar, é necessário realizar um ensaio para determinar o limite de solubilidade de cada produto químico em estudo e identificar a gama de concentrações a utilizar na condução do protocolo de ensaio. O limite de solubilidade de cada produto químico em estudo no solvente deve ser objeto de determinação preliminar e confirmado em condições de ensaio. A concentração final estudada no ensaio não deve exceder 1 mM. O ensaio de determinação da gama inclui um controlo do solvente, juntamente com, pelo menos, 8 diluições sequenciais, com início na concentração máxima aceitável (por exemplo: 1 mM ou menos, com base no limite de solubilidade) e a presença de ligeira turbidez ou precipitado (ver também o ponto 35). O produto químico em estudo deve ser ensaiado utilizando curvas de intervalos de concentrações de 8 log, tal como definido no ensaio de determinação de gama anterior. As concentrações na segunda e na terceira experiência devem ser ajustadas na medida do necessário para caracterizar melhor a curva concentração-resposta.

34. As diluições do produto químico em estudo devem ser preparadas no solvente adequado (ver ponto 26 do apêndice 2). Se a concentração mais elevada do produto químico em estudo não for solúvel nem em etanol nem em DMSO e a introdução de um novo solvente implicar uma concentração de solvente no tubo final superior ao limite aceitável, a concentração mais elevada pode ser reduzida para a concentração imediatamente inferior. Neste caso, pode acrescentar-se uma concentração adicional na extremidade inferior da série de concentrações. As outras concentrações das séries devem permanecer inalteradas.

35. As soluções do produto químico em estudo devem ser monitorizadas de perto quando adicionadas ao poço de ensaio, uma vez que o produto químico em estudo precipitar para fora do poço. Os dados relativos a todos os poços que contenham precipitado não devem ser tidos em conta e os respetivos motivos de exclusão devem ser anotados.

36. Se houver informação prévia, de outras fontes, que forneça o log(IC_{50}) de um produto químico em estudo, pode ser conveniente espaçar as diluições de forma geométrica, mais perto do log(IC_{50}) esperado, ou seja, 0,5 unidades logarítmicas em torno do log(IC_{50}) esperado. O resultado final deve refletir a extensão suficiente das concentrações para os dois lados do log(IC_{50}), incluindo o «topo» e o «base», de modo a que a curva de ligação possa ser adequadamente caracterizada.

Organização da placa de ensaio

37. Devem preparar-se placas de microtitulação marcadas – tendo em conta as incubações sêxtuplas – com códigos para o controlo do solvente, a concentração mais elevada do estrogénio de referência (que serve igualmente como indicador de ligação não específica – NSB) e o controlo do tampão, tendo em mente as incubações triplas com códigos para cada uma das oito concentrações do controlo não ligante (octiltrietoxissilano), as sete concentrações mais baixas do estrogénio de referência, as oito concentrações das doses do ligante fraco e as oito concentrações de cada produto químico em estudo (TC). No quadro 4 figura um exemplo do diagrama da placa para as curvas de concentração inteiras dos estrogénios de referência e do controlo. São utilizadas placas de microtitulação adicionais para os produtos químicos em estudo, placas essas que devem incluir controlos de placa, nomeadamente 1) uma concentração elevada (deslocamento máximo) e média (aproximadamente a IC_{50}) de cada um dos E2 e ligante fraco em triplicado; 2) controlo do solvente e ligação não específica, cada uma sextuplicada (quadro 5). O apêndice 2.3 apresenta um exemplo de folha de cálculo com um esquema de configuração das placas de microtitulação com três produtos químicos em estudo desconhecidos para o ensaio de ligação competitiva. As concentrações indicadas nos quadros 4 e 5 são as concentrações finais do

▼M8

ensaio. A concentração máxima para E2 deve ser 1×10^{-7} M; para o ligante fraco, deve ser usada a concentração mais elevada utilizada para o mesmo na placa 1. A concentração IC_{50} deve ser determinada pelo laboratório com base na sua base de dados históricos de controlo. Espera-se que esse valor seja semelhante ao observado nos estudos de validação (ver quadro 1).

Quadro 4

Configuração das placas de microtitulação do ensaio de ligação competitiva, curvas de concentração inteiras para o estrogénio e os controlos de referência (placa 1)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TB (apenas solvente)			TB (apenas solvente)			NSB			NSB		
B	E2 (1×10^{-7})			E2 (1×10^{-8})			E2 ($1\times10^{-8,5}$)			E2 (1×10^{-9})		
C	E2 ($1\times10^{-9,5}$)			E2 (1×10^{-10})			E2 (1×10^{-11})			Branco (*)		
D	NE ($1\times10^{-4,5}$)			NE (1×10^{-5})			NE ($1\times10^{-5,5}$)			NE (1×10^{-6})		
E	NE ($1\times10^{-6,5}$)			NE (1×10^{-7})			NE ($1\times10^{-7,5}$)			NE ($1\times10^{-8,5}$)		
F	OTES (1×10^{-3})			OTES (1×10^{-4})			OTES (1×10^{-5})			OTES (1×10^{-6})		
G	OTES (1×10^{-7})			OTES (1×10^{-8})			OTES (1×10^{-9})			OTES (1×10^{-10})		
H	Vazio (para quente) (**)			Vazio (para quente) (**)			Tampão de controlo			Tampão de controlo		

Neste exemplo, o ligando fraco é o noretinodrel (NE)
(*) Vazio verdadeiro, poço não utilizado
(**) Vazio não utilizado durante a incubação, mas utilizado para confirmar a radioatividade total adicionada.

Quadro 5

Configuração das placas de microtitulação do ensaio de ligação competitiva, curvas de concentração para os produtos químicos em estudo e controlos da placa

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TB (apenas solvente)			TB (apenas solvente)			NSB			NSB		
B	TC1 (1×10^{-3})			TC1 (1×10^{-4})			TC1 (1×10^{-5})			TC1 (1×10^{-6})		
C	TC1 (1×10^{-7})			TC1 (1×10^{-8})			TC1 (1×10^{-9})			TC1 (1×10^{-10})		
D	TC2 (1×10^{-3})			TC2 (1×10^{-4})			TC2 (1×10^{-5})			TC2 (1×10^{-6})		
E	TC2 (1×10^{-7})			TC2 (1×10^{-8})			TC2 (1×10^{-9})			TC2 (1×10^{-10})		
F	TC3 (1×10^{-3})			TC3 (1×10^{-4})			TC3 (1×10^{-5})			TC3 (1×10^{-6})		
G	TC3 (1×10^{-7})			TC3 (1×10^{-8})			TC3 (1×10^{-9})			TC3 (1×10^{-10})		
H	NE (IC_{50})			NE ($1\times10^{-4,5}$)			E2 (IC_{50})			E2 (1×10^{-7})		

Neste exemplo, o ligando fraco é o noretinodrel (NE)

▼M8

Realização do ensaio de ligação competitiva

38. Conforme se mostra no quadro 6, devem ser adicionados aos poços 80 µl de solvente de controlo do estrogénio de referência, ligante fraco, não ligante e produtos químicos em estudo, preparados em tampão de ensaio. Em seguida, deve adicionar-se a cada poço 40 µl de uma solução de 4 nM [3H]17β--estradiol. Após uma rotação delicada durante 10 a 15 minutos, entre 2 e 15 °C, adicionam-se 40 µl da solução de hrERα. As placas de microtitulação do ensaio devem ser incubadas a uma temperatura de 2 a 8 °C, durante 16-20 horas, e colocadas num mecanismo de rotação durante o período de incubação.

Quadro 6

Quantidade de componentes de ensaio para o ensaio de ligação competitiva nos hrER, placas microtituladoras

Volume (µl)	Componente
80	17β-Estradiol não marcado, noretinodrel, OTES, produtos químicos em estudo, solvente ou solução-tampão
40	Solução de 4 nM [^{3}H]17β-estradiol
40	Solução de hrERα com a concentração determinada
160	***Volume total em cada poço***

39. Deve proceder-se à quantificação do valor da ligação do [^{3}H]17β-estradiol ao hrERα, após a separação do [^{3}H]17β-estradiol ligado ao hrERα do [^{3}H]17β--estradiol livre mediante a adição de 80 µl de suspensão de DCC fria a cada poço, conforme descrito nos pontos 20 a 23, para o ensaio de ligações por saturação.

40. Os poços H1-6 [identificados como «vazio (para quente)» no quadro 4] representam o dpms do [^{3}H]17β-estradiol marcado em 40 µl. A alíquota de 40 µl deve ser diretamente depositada no fluido de cintilação, nos poços H1-H6.

Critérios de aceitabilidade

Ensaio de ligação por saturação

41. A curva de ligação específica deve atingir um patamar elevado à medida em que forem sendo utilizadas concentrações crescentes de [^{3}H]17β-estradiol, indicando saturação do hrERα com o ligando.

42. A ligação específica a 1 nM de [3H]17β-estradiol deve situar-se no intervalo aceitável, entre 15 % e 25 % da radioatividade total média medida adicionada entre séries de ensaios. São aceitáveis pequenos desvios a este intervalo, mas se as séries de ensaios se situarem permanentemente fora deste intervalo de variação, ou se uma séries de ensaios estiver consideravelmente fora deste intervalo, a concentração de proteínas deve ser ajustada, repetindo-se o ensaio de saturação.

43. Os dados devem produzir um diagrama linear de Scatchard.

44. A ligação não específica não deve ser excessiva. O seu valor deve, normalmente, ser < 35 % da ligação total. No entanto, o rácio pode, ocasionalmente, ultrapassar este limite se for medido um dpm muito baixo para a concentração mais baixa de 17β-estradiol com marcação radioativa.

▼**M8**

Ensaio de ligação competitiva

45. O aumento das concentrações do 17β-estradiol não marcado deve deslocar o [^{3}H]17β-estradiol do recetor de forma compatível com uma ligação competitiva num ponto.

46. O valor de IC_{50} para o estrogénio de referência (17β-estradiol) deve ser aproximadamente igual à concentração molar de [^{3}H]17β-estradiol mais o Kd determinado a partir do ensaio de saturação da ligação.

47. Nas séries de ensaios, a ligação específica total deve estar sistematicamente dentro de um intervalo aceitável de 20±5 % se a concentração média de radioatividade total medida adicionada a cada poço for de 1 nM. São aceitáveis pequenos desvios, mas, se as séries de ensaios se situarem permanentemente fora deste intervalo de variação, ou se uma série de ensaios se situar consideravelmente fora do mesmo, a concentração de proteínas deve ser ajustada.

48. O solvente não deve alterar a sensibilidade ou a reprodutibilidade do ensaio. Os resultados do controlo do solvente (poços de TB) são comparados com o controlo de tampão, a fim de verificar se o solvente utilizado não afeta o sistema de ensaio. Os resultados do TB e do controlo da solução-tampão devem ser comparáveis se não houver nenhum efeito do solvente no ensaio.

49. O não ligante não deve deslocar mais de 25 % do [^{3}H]17β-estradiol do hrERα quando ensaiado a até 10^{-3} M (OTES) ou 10^{-4} M (DBP).

50. Foram estabelecidos critérios de desempenho para os estrogénios de referência e dois ligantes fracos (noretinodrel, noretindrona), com base nos dados do estudo de validação do ensaio de ligação FW hrER FW (anexo N da referência 2). Estão previstos intervalos de confiança de 95 % para DPDP (n) ±±DPDP médio em todos os controlos em todos os laboratórios que participam no estudo de validação. Foram calculados intervalos de confiança de 95 % para os parâmetros de ajustamento da curva [ou seja, topo, base, curva de Hill, $\log(IC_{50})$]$\log IC_{50}$) para os estrogénios de referência e ligantes fracos, e para o $\log_{10}$ (RBA)$\log_{10}$RBA com base nos estrogénios de referência e são fornecidos como critérios de desempenho para os controlos positivos. O quadro 1 apresenta os intervalos previstos para os parâmetros de ajustamento da curva que podem ser utilizados como critérios de desempenho. Na prática, o intervalo de variação do IC_{50} pode variar ligeiramente com base no Kd da preparação do recetor e na concentração do ligando.

51. Não foram definidos critérios de desempenho para os parâmetros de ajustamento da curva em relação aos produtos químicos em estudo, devido à grande variedade de produtos químicos em estudo existentes e à variação das principais afinidades e dos resultados (p. ex., curva inteira, curva parcial, sem ajustamento de curva). Contudo, devem ser utilizados critérios profissionais aquando da avaliação dos resultados de cada série de ensaios para um produto químico em estudo. Deve utilizar-se uma gama de concentrações do produto suficiente para definir claramente o topo (por exemplo, 90-100 % de ligação) da curva de ligação competitiva. A variabilidade dos replicados para cada concentração do produto químico em estudo, bem como entre as 3 séries não paralelas, deve ser razoável e cientificamente aceitável. Os controlos de cada série de ensaios em relação a um produto químico em estudo devem aproximar-se das medições de desempenho comunicadas para este ensaio do FW e ser coerentes com os dados históricos de controlo de cada laboratório.

▼M8

ANÁLISE DOS DADOS

Ensaio de ligação por saturação

52. São medidas as ligações totais e as ligações não específicas. A partir destes valores, a ligação específica de concentrações crescentes de [^{3}H]17β-estradiol em condições de equilíbrio é calculada subtraindo-se a ligação não específica do total. Um gráfico que apresente a ligação específica *versus* a concentração de [^{3}H]17β-estradiol deve atingir um plano para o indicativo máximo específico da ligação por saturação do hrERα [^{3}H-17H]β-estradiol. Além disso, a análise dos dados deve documentar a ligação do [^{3}H]17β-estradiol a um único ponto de ligação de alta afinidade. As ligações não específicas, totais e específicas devem ser visíveis numa curva de ligação por saturação. Uma análise mais aprofundada destes dados deve utilizar uma análise de regressão não linear (ex., BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) com uma apresentação final dos dados de acordo com Scatchard.

53. A análise de dados deve determinar a $B_{máx}$ e Kd a partir, unicamente dos dados relativos à ligação total, partindo do pressuposto de que a ligação não específica é de linear, salvo se for justificada a utilização de outro método. Ao determinar a melhor adequação, importa efetuar uma regressão sólida, salvo justificação. Deve indicar-se o método escolhido para uma regressão sólida. A correção da depleção de ligando (por exemplo, utilizando o método de Swillens 1995) deve ser sempre utilizada na determinação de $B_{máx}$ e Kd a partir dos dados da ligação por saturação.

Ensaio de ligação competitiva

54. A curva de ligação competitiva é representada como a ligação específica do [^{3}H]17β-estradiol *versus* a concentração (log 10 unidades) do concorrente. A concentração do produto químico em estudo que inibe 50 % da ligação máxima específica do [^{3}H]17β-estradiol é IC_{50}.

55. As estimativas de log(IC_{50}) para os controlos positivos (por exemplo, estrogénios de referência e ligantes fracos) devem ser determinadas com recurso a um *software* de ajustamento não linear de ajustamento adequado, a fim de se adaptar à equação de quatro parâmetros de Hill (p. ex., BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995). Em geral, o topo, a base, a curva e o log(IC_{50}) devem ser mantidos inalterados quando se ajustam as curvas. Quando se determinar a melhor adequação, deve utilizar-se uma regressão sólida, a menos que seja apresentada uma justificação. Não devem ser feitas correções para a depleção do ligando. Após a análise inicial, cada curva de ligação deve ser avaliada de modo a garantir a devida adequação ao modelo. A afinidade de ligação relativa (RBA) do ligando fraco deve ser calculada como percentagem do log(IC_{50}) para o ligante fraco em relação ao log(IC_{50}) para o 17β-estradiol. Os resultados dos controlos positivos e do controlo não ligante devem ser avaliados de acordo com as medidas do desempenho do ensaio constantes dos pontos 45 a 50 do presente apêndice 2.

56. Os dados relativos a todos os produtos químicos em estudo devem ser analisados através de uma abordagem por etapas, para garantir que os dados são devidamente analisados e que cada ligação competitiva é devidamente classificada. Recomenda-se que cada série de ensaios para um produto químico em estudo seja inicialmente submetida a uma análise normalizada de dados idêntica à utilizada para os estrogénios de referência e para controlos de ligantes fracos (ponto 55). Uma vez concluída, deve ser efetuada uma avaliação técnica dos parâmetros de ajustamento da curva, bem como uma análise visual do grau de adequação dos dados à curva de ligação competitiva gerada para cada série de ensaios. Durante esta avaliação técnica, as observações de uma diminuição dependente da concentração do [^{3}H]17β--estradiol especificamente ligado, da baixa variabilidade entre os replicados técnicos em cada concentração do produto químico em estudo e da coerência dos parâmetros de ajustamento entre as três séries de ensaios constituem uma boa indicação de que a análise de ensaios e de dados foi realizada de forma adequada.

▼M8

Interpretação dos dados

57. Caso se cumpram todos os critérios de aceitabilidade, o produto químico em estudo é considerado um ligante para o hrERα se for possível ajustar uma curva ligação e o ponto mais baixo da curva de resposta dentro da gama de dados for inferior a 50 % (figura 1).

58. O produto químico em estudo é considerado como não ligante se, cumpridos todos os critérios de aceitabilidade:

— for possível ajustar uma curva de ligação e o ponto mais baixo da curva de resposta dentro da gama de dados for superior a 75 %, ou

— não for possível ajustar uma curva de ligação e a média percentual mais baixa não ajustada entre os grupos de concentração dos dados for superior a 75 %.

59. Os produtos químicos em estudo são considerados equívocos se nenhuma das condições acima referidas estiver preenchida (por exemplo, o ponto mais baixo da curva de resposta ajustada situa-se entre 76 e 51 %).

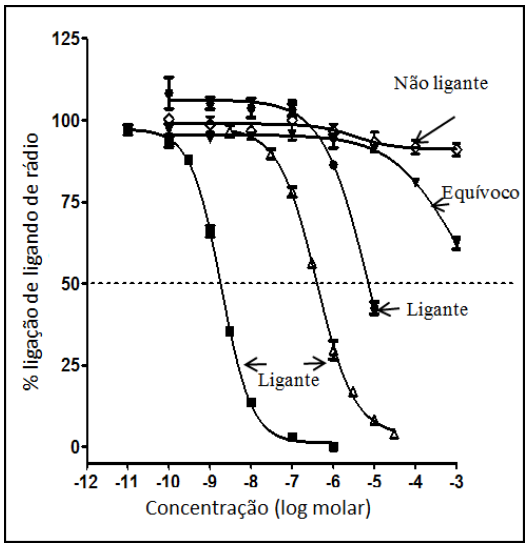
Quadro 7

Critérios para classificação com base numa curva de ligação competitiva para um produto químico em estudo

Classificação	Critérios
Ligante[a]	Uma curva de ligação pode ser ajustada. O **ponto mais baixo na curva de resposta dentro da gama de dados é inferior a 50 %**.
Não ligante[b]	Se for possível ajustar a curva de ligação, o **ponto mais baixo da curva de resposta dentro da gama de dados é superior a 75 %**. Se não for possível ajustar a curva de ligação, a **média percentual mais baixa não ajustada entre os grupos de concentração nos dados é superior a 75 %**.
Inconclusivo[c]	Qualquer produto químico em estudo que não seja ligante nem não ligante. (Por exemplo, o ponto mais baixo da curva de resposta ajustada situa-se entre 76 e 51 %).

Figura 1

Exemplos de classificação de produtos químicos em estudo por meio de uma curva de ligação competitiva



▼**M8**

60. As várias séries de ensaios realizados num laboratório para um produto químico em estudo são combinadas através da atribuição de valores numéricos a cada série de ensaios e fazendo a média das diferentes séries, como se indica no quadro 8. Os resultados para as séries combinadas em cada laboratório são comparados com a classificação prevista para cada produto químico em estudo.

Quadro 8

Método de classificação do produto químico em estudo utilizando múltiplas séries de ensaios

Para atribuir valor a cada série de ensaios	
Classificação	**Valor numérico**
Ligante	2
Inconclusivo	1
Não ligante	0
Para classificar a média dos valores numéricos das diferentes séries de ensaios	
Classificação	**Valor numérico**
Ligante	Média ≥ 1,5
Inconclusivo	0,5 ≤ média < 1,5
Não ligante	Média < 0,5

RELATÓRIO DO ENSAIO

61. Ver ponto 24 da secção «**COMPONENTES DO ENSAIO DE LIGAÇÃO DO hrER**»

▼**M8**

Apêndice 2.1

LISTA DE TERMOS

DCC: carvão revestido com dextrose.

[^{3}H]E2: 17β-estradiol com marcação radioativa por trítio.

E2: 17β-estradiol não marcado (inerte).

hrERα: recetor alfa de estrogénio recombinante humano.

Replicado: um ou vários poços que contêm o mesmo conteúdo com as mesmas concentrações e que são objeto de ensaios paralelos numa única série de ensaios. Neste protocolo, cada concentração do produto químico em estudo é ensaiada em triplicado; isto é, existem três replicados que são ensaiados simultaneamente em cada concentração do produtos químicos em estudo.

Série de ensaios: conjunto completo de poços de placas de microtitulação que fornece todas as informações necessárias para caracterizar a ligação de um produto químico em estudo ao hrERα (viz., total [^{3}H]17β-estradiol adicionado ao poço, ligação máxima do [^{3}H]17β-estradiol ao hrERα ligação não específica e ligação total em diferentes concentrações do produto químico em estudo). Uma série de ensaio pode consistir em apenas um poço bem (ou seja, replicado) por concentração; contudo, dado que este protocolo requer que os ensaios sejam realizados em triplicado, uma série de ensaios consiste em três poços por concentração. Além disso, este protocolo requer três séries de ensaio independentes (ou seja, não paralelas) por produto químico.

Tampão de ensaio: 10 mM Tris, 10 mg de albumina de soro bovino/ml, 2 mM TDT, 10 % de glicerol, 0,2 mM leupeptina, pH 7,5.

▼**M8**

Apêndice 2.2

ENSAIO DE SATURAÇÃO TÍPICA DO [^{3}H]17B-ESTRADIOL COM TRÊS POÇOS REPLICADOS

Ensaio de saturação típica do [^{3}H]17β-estradiol com três poços replicados

Posição	Replicado	Código do tipo do poço	Concentração inicial a quente de E2 (nM)	Volume a quente do E2 (µl)	Concentração final a quente do E2 (nM)	Concentração inicial a frio do E2 (µM)	Volume a frio do E2 (µl)	Concentração final a frio do E2 (µM)	Volume do tampão (µl)	Volume do recetor (µl)	Volume total em poços
A1	1	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A2	2	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A3	3	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A4	1	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A5	2	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A6	3	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A7	1	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A8	2	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A9	3	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A10	1	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
A11	2	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
A12	3	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
B1	1	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B2	2	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B3	3	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B4	1	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B5	2	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B6	3	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B7	1	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160
B8	2	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160

▼M8

Ensaio de saturação típica do [^{3}H]17β-estradiol com três poços replicados

Posição	Replicado	Código do tipo do poço	Concentração inicial a quente de E2 (nM)	Volume a quente do E2 (µl)	Concentração final a quente do E2 (nM)	Concentração inicial a frio do E2 (µM)	Volume a frio do E2 (µl)	Concentração final a frio do E2 (µM)	Volume do tampão (µl)	Volume do recetor (µl)	Volume total em poços
B9	3	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160
B10	1	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
B11	2	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
B12	3	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
D1	1	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D2	2	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D3	3	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D4	1	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D5	2	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D6	3	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D7	1	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D8	2	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D9	3	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D10	1	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160
D11	2	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160
D12	3	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160
E1	1	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E2	2	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E3	3	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E4	1	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160
E5	2	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160
E6	3	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160

▼**M8**

Ensaio de saturação típica do [^{3}H]17β-estradiol com três poços replicados

Posição	Replicado	Código do tipo do poço	Concentração inicial a quente de E2 (nM)	Volume a quente do E2 (µl)	Concentração final a quente do E2 (nM)	Concentração inicial a frio do E2 (µM)	Volume a frio do E2 (µl)	Concentração final a frio do E2 (µM)	Volume do tampão (µl)	Volume do recetor (µl)	Volume total em poços
E7	1	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E8	2	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E9	3	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E10	1	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
E11	2	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
E12	3	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
G1	1	Quente	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G2	2	Quente	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G3	3	Quente	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G4	1	Quente	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G5	2	Quente	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G6	3	Quente	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G7	1	Quente	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G8	2	Quente	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G9	3	Quente	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G10	1	Quente	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G11	2	Quente	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G12	3	Quente	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40

▼**M8**

Ensaio de saturação típica do [^{3}H]17β-estradiol com três poços replicados

Posição	Replicado	Código do tipo do poço	Concentração inicial a quente de E2 (nM)	Volume a quente do E2 (µl)	Concentração final a quente do E2 (nM)	Concentração inicial a frio do E2 (µM)	Volume a frio do E2 (µl)	Concentração final a frio do E2 (µM)	Volume do tampão (µl)	Volume do recetor (µl)	Volume total em poços
H1	1	Quente	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H2	2	Quente	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H3	3	Quente	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H4	1	Quente	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H5	2	Quente	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H6	3	Quente	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H7	1	Quente	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H8	2	Quente	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H9	3	Quente	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H10	1	Quente	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H11	2	Quente	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H12	3	Quente	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40

Note-se que os poços «quentes» estão vazios durante a incubação. Os 40 µl são adicionados apenas para contagem de cintilação.

▼**M8**

Apêndice 2.3

CONFIGURAÇÃO DO ENSAIO DE LIGAÇÃO COMPETITIVA

Placa	Posição	Replicado	Tipo de poço	Código do poço	Código de concentração	Concentração inicial do concorrente (M)	Solução de reserva de hrER (µl)	Volume do tampão (µl)	Volume (µl) do traçador (E2 quente)	Volume a partir da placa de diluição (µl)	Volume final (µl)	Concentração final concorrente (M)
S	A1	1	Ligação total	TB	TB1	—	40		40	80	160	—
S	A2	2	Ligação total	TB	TB2	—	40		40	80	160	—
S	A3	3	Ligação total	TB	TB3	—	40		40	80	160	—
S	A4	1	Ligação total	TB	TB4	—	40		40	80	160	—
S	A5	2	Ligação total	TB	TB5	—	40		40	80	160	—
S	A6	3	Ligação total	TB	TB6	—	40		40	80	160	—
S	A7	1	E2 frio (elevado)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	A8	2	E2 frio (elevado)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	A9	3	E2 frio (elevado)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	A10	1	E2 frio (elevado)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	A11	2	E2 frio (elevado)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	A12	3	E2 frio (elevado)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	B1	1	E2 frio	S	S1	2,00E-07	40	—	40	80	160	1,0E-07
S	B2	2	E2 frio	S	S1	2,00E-07	40	—	40	80	160	1,0E-07
S	B3	3	E2 frio	S	S1	2,00E-07	40	—	40	80	160	1,0E-07
S	B4	1	E2 frio	S	S2	2,00E-08	40	—	40	80	160	1,0E-08

▼**M8**

Placa	Posição	Replicado	Tipo de poço	Código do poço	Código de concentração	Concentração inicial do concorrente (M)	Solução de reserva de hrER (µl)	Volume do tampão (µl)	Volume (µl) do traçador (E2 quente)	Volume a partir da placa de diluição (µl)	Volume final (µl)	Concentração final concorrente (M)
S	B5	2	E2 frio	S	S2	2,00E-08	40	—	40	80	160	1,0E-08
S	B6	3	E2 frio	S	S2	2,00E-08	40	—	40	80	160	1,0E-08
S	B7	1	E2 frio	S	S3	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E-09
S	B8	2	E2 frio	S	S3	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E-09
S	B9	3	E2 frio	S	S3	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E-09
S	B10	1	E2 frio	S	S4	2,00E-09	40	—	40	80	160	1,0E-09
S	B11	2	E2 frio	S	S4	2,00E-09	40	—	40	80	160	1,0E-09
S	B12	3	E2 frio	S	S4	2,00E-09	40	—	40	80	160	1,0E-09
S	C1	1	E2 frio	S	S5	6,00E-10	40	—	40	80	160	3,0E-10
S	C2	2	E2 frio	S	S5	6,00E-10	40	—	40	80	160	3,0E-10
S	C3	3	E2 frio	S	S5	6,00E-10	40	—	40	80	160	3,0E-10
S	C4	1	E2 frio	S	S6	2,00E-10	40	—	40	80	160	1,0E-10
S	C5	2	E2 frio	S	S6	2,00E-10	40	—	40	80	160	1,0E-10
S	C6	3	E2 frio	S	S6	2,00E-10	40	—	40	80	160	1,0E-10
S	C7	1	E2 frio	S	S7	2,00E-11	40	—	40	80	160	1,0E-11
S	C8	2	E2 frio	S	S7	2,00E-11	40	—	40	80	160	1,0E-11

▼**M8**

Placa	Posição	Replicado	Tipo de poço	Código do poço	Código de concentração	Concentração inicial do concorrente (M)	Solução de reserva de hrER (µl)	Volume do tampão (µl)	Volume (µl) do traçador (E2 quente)	Volume a partir da placa de diluição (µl)	Volume final (µl)	Concentração final concorrente (M)
S	C9	3	E2 frio	S	S7	2,00E-11	40	—	40	80	160	1,0E-11
S	C10	1	Vazio	Vazio	B1	—	—	160	—	—	160	—
S	C11	2	Vazio	Vazio	B2	—	—	160	—	—	160	—
S	C12	3	Vazio	Vazio	B3	—	—	160	—	—	160	—
S	D1	1	Noretinodrel	NE	WP1	6,00E-05	40	—	40	80	160	3,0E-05
S	D2	1	Noretinodrel	NE	WP1	6,00E-05	40	—	40	80	160	3,0E-05
S	D3	1	Noretinodrel	NE	WP1	6,00E-05	40	—	40	80	160	3,0E-05
S	D4	1	Noretinodrel	NE	WP2	2,00E-05	40	—	40	80	160	1,0E-05
S	D5	1	Noretinodrel	NE	WP2	2,00E-05	40	—	40	80	160	1,0E-05
S	D6	1	Noretinodrel	NE	WP2	2,00E-05	40	—	40	80	160	1,0E-05
S	D7	1	Noretinodrel	NE	WP3	6,00E-06	40	—	40	80	160	3,0E-06
S	D8	1	Noretinodrel	NE	WP3	6,00E-06	40	—	40	80	160	3,0E-06
S	D9	1	Noretinodrel	NE	WP3	6,00E-06	40	—	40	80	160	3,0E-06
S	D10	1	Noretinodrel	NE	WP4	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	D11	1	Noretinodrel	NE	WP4	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	D12	1	Noretinodrel	NE	WP4	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	E1	1	Noretinodrel	NE	WP	6,00E-07-	40		40	80	160	3,0E-07
S	E2	2	Noretinodrel	NE	WP	6,00E-07-	40		40	80	160	3,0E-07
S	E3	3	Noretinodrel	NE	WP	6,00E-07-	40		40	80	160	3,0E-07
S	E4	1	Noretinodrel	NE	WP	2,00E-07-	40		40	80	160	1,0E-07
S	E5	2	Noretinodrel	NE	WP	2,00E-07-	40		40	80	160	1,0E-07
S	E6	3	Noretinodrel	NE	WP	2,00E-07-	40		40	80	160	1,0E-07
S	E7	1	Noretinodrel	NE	WP	6,00E-08-	40	—	40	80	160	3,0E-08

▼**M8**

Placa	Posição	Replicado	Tipo de poço	Código do poço	Código de concentração	Concentração inicial do concorrente (M)	Solução de reserva de hrER (µl)	Volume do tampão (µl)	Volume (µl) do traçador (E2 quente)	Volume a partir da placa de diluição (µl)	Volume final (µl)	Concentração final concorrente (M)
S	E8	2	Noretinodrel	NE	WP	6,00E-08-	40	—	40	80	160	3,0E-08
S	E9	3	Noretinodrel	NE	WP	6,00E-08-	40	—	40	80	160	3,0E-08
S	E10	1	Noretinodrel	NE	WP	6,00E-09-	40	—	40	80	160	3,0E-09
S	E11	2	Noretinodrel	NE	WP	6,00E-09-	40	—	40	80	160	3,0E-09
S	E12	3	Noretinodrel	NE	WP	6,00E-09-	40	—	40	80	160	3,0E-09
S	F1	1	OTES	N	OTES	2,00E-03	40	—	40	80	160	1,0E-03
S	F2	2	OTES	N	OTES	2,00E-03	40	—	40	80	160	1,0E-03
S	F3	3	OTES	N	OTES	2,00E-03	40	—	40	80	160	1,0E-03
S	F4	1	OTES	N	OTES	2,00E-04	40	—	40	80	160	1,0E-04
S	F5	2	OTES	N	OTES	2,00E-04	40	—	40	80	160	1,0E-04
S	F6	3	OTES	N	OTES	2,00E-04	40	—	40	80	160	1,0E-04
S	F7	1	OTES	N	OTES	2,00E-05	40	—	40	80	160	3,0E-05
S	F8	2	OTES	N	OTES	2,00E-05	40	—	40	80	160	3,0E-05
S	F9	3	OTES	N	OTES	2,00E-05	40	—	40	80	160	3,0E-05
S	F10	1	OTES	N	OTES	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	F11	2	OTES	N	OTES	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	F12	3	OTES	N	OTES	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	G1	1	OTES	N	OTES	2,00E-07	40	—	40	80	160	3,0E-07
S	G2	2	OTES	N	OTES	2,00E-07	40	—	40	80	160	3,0E-07
S	G3	3	OTES	N	OTES	2,00E-07	40	—	40	80	160	3,0E-07
S	G4	1	OTES	N	OTES	2,00E-08	40	—	40	80	160	1,0E-08
S	G5	2	OTES	N	OTES	2,00E-08	40	—	40	80	160	1,0E-08

▼**M8**

Placa	Posição	Replicado	Tipo de poço	Código do poço	Código de concentração	Concentração inicial do concorrente (M)	Solução de reserva de hrER (µl)	Volume do tampão (µl)	Volume (µl) do traçador (E2 quente)	Volume a partir da placa de diluição (µl)	Volume final (µl)	Concentração final concorrente (M)
S	G6	3	OTES	N	OTES	2,00E-08	40	—	40	80	160	1,0E-08
S	G7	1	OTES	N	OTES	2,00E-09	40	—	40	80	160	1,0E-09
S	G8	2	OTES	N	OTES	2,00E-09	40	—	40	80	160	1,0E-09
S	G9	3	OTES	N	OTES	2,00E-09	40	—	40	80	160	1,0E-09
S	G10	1	OTES	N	OTES	2,00E-10	40	—	40	—	160	1,0E-10
S	G11	2	OTES	N	OTES	2,00E-10	40	—	40	—	160	1,0E-10
S	G12	3	OTES	N	OTES	2,00E-10	40	—	40	—	160	1,0E-10
S	H1	1	Quente	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H2	1	Quente	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H3	1	Quente	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H4	1	Quente	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H5	1	Quente	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H6	1	Quente	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H7	1	Tampão de controlo	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H8	1	Tampão de controlo	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H9	1	Tampão de controlo	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H10	1	Tampão de controlo	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H11	1	Tampão de controlo	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H12	1	Tampão de controlo	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—

Note-se que os poços «quentes» estão vazios durante a incubação. Os 40 µl são adicionados apenas para contagem de cintilação.

▼M8

Configuração do ensaio de ligação competitiva												
Placa	**Posição**	**Replicado**	**Tipo de poço**	**Código do poço**	**Código de concentração**	**Concentração inicial do concorrente (M)**	**Solução de reserva de hrER (µl)**	**Volume de tampões (µl)**	**Volume (µl) do traçador (E2 quente)**	**Volume da placa de diluição (µl)**	**Volume final (µl)**	**Concentração final do concorrente (M)**
P1	A1	1	Ligação total	TB	TBB1B1	—	40	—	40	80	160	—
P1	A2	2	Ligação total	TB	TB2	—	40	—	40	80	160	—
P1	A3	3	Ligação total	TB	TB3	—	40	—	40	80	160	—
P1	A4	1	Ligação total	TB	TB4	—	40	—	40	80	160	—
P1	A5	2	Ligação total	TB	TB5	—	40	—	40	80	160	—
P1	A6	3	Ligação total	TB	TB6	—	40	—	40	80	160	—
P1	A7	1	E2 frio (elevado)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	A8	2	E2 frio (elevado)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	A9	3	E2 frio (elevado)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	A10	1	E2 frio (elevado)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	A11	2	E2 frio (elevado)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	A12	3	E2 frio (elevado)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	B1	1	Produto químico em estudo 1	TC1	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	B2	2	Produto químico em estudo 1	TC1	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	B3	3	Produto químico em estudo 1	TC1	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	B4	1	Produto químico em estudo 1	TC1	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	B5	2	Produto químico em estudo 1	TC1	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	B6	3	Produto químico em estudo 1	TC1	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	B7	1	Produto químico em estudo 1	TC1	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B8	2	Produto químico em estudo 1	TC1	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B9	3	Produto químico em estudo 1	TC1	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B10	1	Produto químico em estudo 1	TC1	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	B11	2	Produto químico em estudo 1	TC1	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	B12	3	Produto químico em estudo 1	TC1	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06

▼M8

Configuração do ensaio de ligação competitiva												
Placa	**Posição**	**Replicado**	**Tipo de poço**	**Código do poço**	**Código de concentração**	**Concentração inicial do concorrente (M)**	**Solução de reserva de hrER (µl)**	**Volume de tampões (µl)**	**Volume (µl) do traçador (E2 quente)**	**Volume da placa de diluição (µl)**	**Volume final (µl)**	**Concentração final do concorrente (M)**
P1	C1	1	Produto químico em estudo 1	TC1	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C2	2	Produto químico em estudo 1	TC1	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C3	3	Produto químico em estudo 1	TC1	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C4	1	Produto químico em estudo 1	TC1	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C5	2	Produto químico em estudo 1	TC1	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C6	3	Produto químico em estudo 1	TC1	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C7	1	Produto químico em estudo 1	TC1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	C8	2	Produto químico em estudo 1	TC1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	C9	3	Produto químico em estudo 1	TC1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	C10	1	Produto químico em estudo 1	TC1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	C11	2	Produto químico em estudo 1	TC1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	C12	3	Produto químico em estudo 1	TC1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	D1	1	Produto químico em estudo 2	TC2	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	D2	2	Produto químico em estudo 2	TC2	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	D3	3	Produto químico em estudo 2	TC2	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	D4	1	Produto químico em estudo 2	TC2	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	D5	2	Produto químico em estudo 2	TC2	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	D6	3	Produto químico em estudo 2	TC2	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	D7	1	Produto químico em estudo 2	TC2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	D8	2	Produto químico em estudo 2	TC2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	D9	3	Produto químico em estudo 2	TC2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	D10	1	Produto químico em estudo 2	TC2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	D11	2	Produto químico em estudo 2	TC2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	D12	3	Produto químico em estudo 2	TC2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06

▼M8

Configuração do ensaio de ligação competitiva												
Placa	**Posição**	**Replicado**	**Tipo de poço**	**Código do poço**	**Código de concentração**	**Concentração inicial do concorrente (M)**	**Solução de reserva de hrER (µl)**	**Volume de tampões (µl)**	**Volume (µl) do traçador (E2 quente)**	**Volume da placa de diluição (µl)**	**Volume final (µl)**	**Concentração final do concorrente (M)**
P1	E1	1	Produto químico em estudo 2	TC2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	E2	2	Produto químico em estudo 2	TC2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	E3	3	Produto químico em estudo 2	TC2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	E4	1	Produto químico em estudo 2	TC2	6	—	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E5	2	Produto químico em estudo 2	TC2	6	—	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E6	3	Produto químico em estudo 2	TC2	6	—	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E7	1	Produto químico em estudo 2	TC2	7	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E8	2	Produto químico em estudo 2	TC2	7	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E9	3	Produto químico em estudo 2	TC2	7	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E10	1	Produto químico em estudo 2	TC2	8	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	E11	2	Produto químico em estudo 2	TC2	8	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	E12	3	Produto químico em estudo 2	TC2	8	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	F1	1	Produto químico em estudo 3	TC3	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F2	2	Produto químico em estudo 3	TC3	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F3	3	Produto químico em estudo 3	TC3	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F4	1	Produto químico em estudo 3	TC3	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F5	2	Produto químico em estudo 3	TC3	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F6	3	Produto químico em estudo 3	TC3	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F7	1	Produto químico em estudo 3	TC3	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F8	2	Produto químico em estudo 3	TC3	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F9	3	Produto químico em estudo 3	TC3	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F10	1	Produto químico em estudo 3	TC3	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	F11	2	Produto químico em estudo 3	TC3	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	F12	3	Produto químico em estudo 3	TC3	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06

▼**M8**

Configuração do ensaio de ligação competitiva												
Placa	**Posição**	**Replicado**	**Tipo de poço**	**Código do poço**	**Código de concentração**	**Concentração inicial do concorrente (M)**	**Solução de reserva de hrER (µl)**	**Volume de tampões (µl)**	**Volume (µl) do traçador (E2 quente)**	**Volume da placa de diluição (µl)**	**Volume final (µl)**	**Concentração final do concorrente (M)**
P1	G1	1	Produto químico em estudo 3	TC3	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G2	2	Produto químico em estudo 3	TC3	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G3	3	Produto químico em estudo 3	TC3	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G4	1	Produto químico em estudo 3	TC3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G5	2	Produto químico em estudo 3	TC3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G6	3	Produto químico em estudo 3	TC3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G7	1	Produto químico em estudo 3	TC3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G8	2	Produto químico em estudo 3	TC3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G9	3	Produto químico em estudo 3	TC3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G10	1	Produto químico em estudo 3	TC3	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	G11	2	Produto químico em estudo 3	TC3	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	G12	3	Produto químico em estudo 3	TC3	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	H1	1	Noretinodrel	NE		IC_{50}	40	0	40	80	160	
P1	H2	2	Noretinodrel	NE		IC_{50}	40	0	40	80	160	
P1	H3	3	Noretinodrel	NE		IC_{50}	40	0	40	80	160	
P1	H4	1	Noretinodrel	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H5	2	Noretinodrel	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H6	3	Noretinodrel	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H7	1	E2 S frio			IC_{50}	40	0	40	80	160	
P1	H8	2	E2 S frio			IC_{50}	40	0	40	80	160	
P1	H9	3	E2 S frio			IC_{50}	40	0	40	80	160	
P1	H10	1	E2 S frio			1,00E-7	40	0	40	80	160	
P1	H11	2	E2 S frio			1,00E-7	40	0	40	80	160	
P1	H12	3	E2 S frio			1,00E-7	40	0	40	80	160	

▼**M8**

Apêndice 3

ENSAIO *IN VITRO* DO LIGAÇÃO AO RECETOR DO ESTROGÉNIO COM RECURSO A UMA PROTEÍNA DE DOMÍNIO DE LIGAÇÃO DO LIGANDO ERα RECOMBINANTE HUMANA DO *CHEMICAL EVALUATION AND RESEARCH INSTITUTE* (CERI)

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES (VER TAMBÉM INTRODUÇÃO GERAL)

1. Este ensaio *in vitro* de ligação por saturação e competitiva ao recetor estrogénico utiliza um domínio de ligação do ligando (LBD) do ERα humano (hrERα). Este modelo de proteína foi produzido pelo Chemicals Evaluation Research Institute (CERI), no Japão, existe como proteína de fusão da glutationa-S-transferase (GST) e é expressa em *Escherichia coli.* O protocolo CERI foi objeto de um estudo internacional de validação em vários laboratórios (2) que demonstrou a sua adequação e fiabilidade para o fim a que se destina o ensaio.

2. Este ensaio é um procedimento de análise para identificação de substâncias suscetíveis de se ligar ao hrERα. É utilizado para determinar a capacidade de um produto químico em estudo para competir com o 17β-estradiol pela ligação ao hrERα-LBD. Os resultados quantitativos do ensaio podem incluir o IC_{50} (uma medição da concentração do produto químico em estudo necessária para deslocar metade do [^{3}H]17β-estradiol do hrERα) e as afinidades de ligação relativas dos produtos químicos em estudo para o hrERα em comparação com o 17β-estradiol. Para fins de análise química, os resultados qualitativos de ensaios aceitáveis podem incluir classificações produtos químicos em estudo como ligantes ou não ligantes do hrERα, ou como inconclusivos com base nos critérios descritos para as curvas de ligação.

3. O ensaio utiliza ligandos radioativos que requerem que o laboratório possua uma licença para materiais radioativos. Todos os procedimentos com radioisótopos e produtos químicos perigosos devem seguir a regulamentação e os procedimentos previstos na legislação nacional.

4. As secções «**INTRODUÇÃO GERAL**» e «**COMPONENTES DO ENSAIO DE LIGAÇÃO DO hrER**» devem ser lidas antes de o presente ensaio ser utilizado para fins normativos. As definições e abreviaturas utilizadas no presente método de ensaio são descritas no apêndice 1.

PRINCÍPIOS DO ENSAIO (VER TAMBÉM INTRODUÇÃO GERAL)

5. O ensaio de ligação ao hrERα mede a capacidade de um ligando com marcação radioativa ([^{3}H]17β-estradiol) para se ligar com o ER na presença de concentrações crescentes de um produto químico em estudo (concorrente). Os produtos químicos em estudo que possuem uma elevada afinidade para o ER competem com o ligando com marcação radioativa a uma concentração mais baixa comparativamente com os produtos químicos com menor afinidade para o recetor.

6. O presente ensaio é composto por dois componentes principais: uma experiência de ligantes por saturação com vista a caracterizar os parâmetros da interação recetor-ligando, seguida de uma experiência de ligantes competitivos que caracteriza a concorrência entre um produto químico em estudo e um ligando com marcação radioativa para ligação ao ER.

▼M8

7. O objetivo da experiência de ligação por saturação é caracterizar um determinado lote de recetores relativamente à sua afinidade de ligação e número de recetores em preparação para a realização da experiência de ligação competitiva. A experiência de ligação por saturação mede, em condições de equilíbrio, a afinidade de uma concentração fixa do recetor de estrogénio com o seu ligando natural (representado pela constante de dissociação, Kd) e a concentração de pontos de recetores ativos ($B_{máx}$).

8. A experiência de ligação competitiva mede a afinidade de uma substância para competir com o ([^{3}H]17β-estradiol) pela ligação ao ER. A afinidade é quantificada pela concentração do produto químico em estudo que, em equilíbrio, inibe 50 % do ligante específico do ([^{3}H]17β-estradiol (designada «concentração inibidora 50 %» ou «IC_{50}»). A afinidade pode igualmente ser avaliada através da afinidade de ligação relativa (RBA, em relação à IC_{50} do estradiol, medida separadamente na mesma série de ensaios). A experiência de ligação competitiva mede a ligação do ([^{3}H]17β-estradiol) a uma concentração fixa na presença de uma vasta gama de concentrações (oito ordens de grandeza) do produto químico em estudo. Os dados são, então, ajustados, na medida do possível, a uma forma da equação de Hill (Hill, 1910) que descreve o deslocamento do ligando radioativo através de um ligante concorrente num ponto. A extensão do deslocação do estradiol com marcação radioativa em equilíbrio é utilizada para caracterizar o produto químico em estudo como ligante, não ligante ou inconclusivo.

PROCEDIMENTO

Demonstração do desempenho proteico aceitável do hrERα

9. Antes de realizar rotineiramente os ensaios de ligação por saturação e de ligação competitiva, deve verificar-se se cada novo lote de hrERα tem um desempenho correto no laboratório em que será usado. Para demonstrar esse desempenho, deve ser utilizado um processo em duas etapas:

— Realização de um ensaio de ligação por saturação [^{3}H]17β-estradiol para demonstrar a especificidade e a saturação do hrERα. A análise de regressão não linear de tais dados (por exemplo, BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) e a subsequente equação de Scatchard devem documentar a afinidade de ligação do hrERα com o [^{3}H]17β-estradiol (Kd) e o número de recetores ($B_{máx}$) de cada lote de hrERα.

— Realizar um ensaio de ligação competitiva com recurso às substâncias de controlo [estrogénio de referência (17β-estradiol)], um ligante fraco (por exemplo, noretinodrel ou norentinodrona), e um não ligante (octiltrietoxissilano, OTES). Cada laboratório deve estabelecer uma base de dados histórica para documentar a coerência do IC_{50} e os valores relevantes para os estrogénios de referência e de um ligante fraco entre as experiências e os diferentes lotes de hrERα. Além disso, os parâmetros das curvas de ligação competitiva para as substâncias de controlo devem situar-se dentro dos limites do intervalo de confiança de 95 % (ver quadro 1) que foram desenvolvidos com recurso a dados de laboratórios que participaram no estudo de validação deste ensaio (2).

Quadro 1

Critérios de desempenho desenvolvidos para os estrogénios de referência e para o ligante fraco, ensaio de ligação de hrER do CERI

Substância	Parâmetro	Média [a]:	Desvio-padrão (n)	Intervalos de confiança de 95 % [b]	
				Limite inferior	Limite superior
17β-estradiol	Topo	104,74	13,12 (70)	101,6	107,9
	Base	0,85	2,41 (70)	0,28	1,43

▼M8

Substância	Parâmetro	Média (a):	Desvio-padrão (n)	Intervalos de confiança de 95 % (b)	
				Limite inferior	Limite superior
	Curva de Hill	–1,22	0,20 (70)	–1,27	–1,17
	$log(IC_{50})$	–8,93	0,23 (70)	–8,98	–8,87
Noretinodrel	Topo	101,31	10,55 (68)	98,76	103,90
	Base	2,39	5,01 (68)	1,18	3,60
	Curva de Hill	–1,04	0,21 (68)	–1,09	–0,99
	$log(IC_{50})$	–6,19	0,40 (68)	–6,29	–6,10
Noretindrona (c)	Topo	92,27	7,79 (23)	88,90	95,63
	Base	16,52	10,59 (23)	11,94	21,10
	Curva de Hill	–1,18	0,32 (23)	–1,31	–1,04
	$log(IC_{50})$	–6,01	0,54 (23)	–6,25	–5,78

(a) O desvio-padrão médio com (dimensão da amostra n) foi calculado utilizando estimativas ajustadas da curva (equação de 4 dos parâmetros de Hill) para séries de ensaios de controlo realizados em quatro laboratórios durante o estudo de validação (ver anexo N da referência 2).

(b) A confiança de 95 % é fornecida como orientação para os critérios de aceitabilidade.

(c) O ensaio de noretindrona era facultativo para a subtarefa 4 durante o estudo de validação (ver referência bibliográfica 2, ver subtarefa 4). Por conseguinte, a média ±DP (n) foi calculada utilizando estimativas ajustadas da curva (equação de 4 parâmetros de Hill) para séries de ensaios de controlo realizadas em dois laboratórios.
A gama do IC_{50} depende do Kd da preparação do recetor e da concentração de ligando com marcação radioativa utilizada em cada laboratório. Admite-se um ajustamento adequado da gama do IC_{50} com base nas condições de realização do ensaio.

Demonstração da competência técnica do laboratório

10. Os pontos 17 e 18 e o quadro 2 da secção «**COMPONENTES DA ENSAIO DE LIGAÇÃO DO hrER**» do presente método de ensaio. Cada ensaio (ligação por saturação e ligação competitiva) deve ser constituído por três séries de ensaios independentes (ou seja, diluições de recetor, produtos químicos e reagentes) em dias diferentes, devendo cada série conter três replicados.

Determinação do da concentração do recetor (hrERα)

11. A concentração do recetor ativo varia ligeiramente em função do lote e das condições de armazenagem. Por esta razão, deve determinar-se a concentração do recetor ativo recebida do fornecedor. Obtém-se, assim, a concentração adequada do recetor ativo no momento da série de ensaios.

12. Em condições correspondentes à ligação competitiva (0,5 nM [^{3}H]-estradiol), as concentrações nominais de recetor de 0,1, 0,2, 0,4 e 1 nM devem ser incubadas na ausência (ligação total) e na presença (ligação não específica)

▼M8

de 1 μM de estradiol não marcado. À ligação específica, calculada como a diferença entre a ligação total e a ligação inespecífica, faz-se corresponder a concentração nominal do recetor. A concentração do recetor que der valores de ligação específicos correspondentes a 40 % da marcação radioativa adicionada está relacionada com a concentração de recetor correspondente, devendo esta concentração ser utilizada para as experiências de saturação e de ligação competitiva. Frequentemente, uma concentração final de hrER de 0,2 nM satisfaz esta condição.

13. Se o critério dos 40 % não puder, repetidamente, ser satisfeito, o procedimento experimental deve ser verificado para deteção de eventuais erros. O incumprimento do critério dos 40 % pode indicar que há muito pouco recetor ativo no lote recombinante, caso em que deve ser considerada a utilização de outro lote de recetores.

Ensaio de saturação

14. Devem ser avaliadas em triplicado oito concentrações crescentes de [^{3}H]17β--estradiol, nas três condições seguintes (ver quadro 2):

a. Ausência de 17β-estradiol não marcado e presença de ER. Esta é a determinação da ligação total por medida da radioatividade nos poços que apenas têm 0,5 nM [^{3}H]17β-estradiol.

b. Presença de uma concentração excessiva (2000 vezes superior) de 17β--estradiol não marcado em relação ao 17β-estradiol marcado e presença de ER. O objetivo desta condição é saturar os pontos de ligação ativos com 17β-estradiol não marcado e, mediante a medição da radioatividade nos poços, determinar a ligação não específica. Qualquer estradiol quente remanescente que possa ligar-se ao recetor é considerado ligante a um ponto não específico, dado que o estradiol frio deve estar numa concentração tão elevada que se liga a todos os pontos disponíveis no recetor.

c. Ausência de 17β-estradiol não marcado e ausência de ER (determinação da radioatividade total)

Preparação de soluções de [^{3}H]17β-estradiol, de 17β-estradiol não marcado e de hrERα

15. Deve preparar-se uma solução de 40 nM de [^{3}H]17β-estradiol a partir de uma solução de 1 μM de [^{3}H]17β-estradiol em DMSO, adicionando DMSO (para preparar 200 nM) e tampão à temperatura ambiente (para preparar 40 nM). Usando esta solução de 40 nM, a série de diluições preparadas do [^{3}H]17β-estradiol, que variam entre 0,313 nM e 40 nM, com tampão de ensaio à temperatura ambiente (conforme representado na coluna 12 do quadro 2). As concentrações finais do ensaio, de 0,0313 a 4,0 nM, serão obtidas mediante a adição de 10 μl destas soluções aos respetivos poços de uma placa de microtitulação com 96 poços (ver quadros 2 e 3). A preparação do tampão de ensaio, cálculo da solução original do [^{3}H]17β-estradiol baseada na sua atividade específica, a preparação de diluições e a determinação das concentrações estão descritas em pormenor no protocolo de CERI (2).

16. As diluições de soluções de 17β-estradiol devem ser preparadas a partir de uma solução de 1 nM 17β-estradiol por adição de tampão de ensaio, a fim de se obter oito concentrações crescentes, compreendidas, inicialmente, entre 0,625 μM e 80 μM. As concentrações finais do ensaio, de 0,0625 to 8 nM, serão obtidas mediante a adição de 10 μl destas soluções aos respetivos poços de uma placa de microtitulação com 96 poços específica para a medição da ligação não específica (ver quadros 2 e 3). A preparação das diluições não marcadas de 17β-estradiol é descrita em pormenor no protocolo do CERI (2).

▼**M8**

17. Deve usar-se a concentração do recetor que dê uma ligação específica de 40±10 % (ver os pontos 12 e 13). A solução de hrERα deve ser preparada com tampão de ensaio gelado imediatamente antes do uso, ou seja, depois de terem sido preparados todos os poços para ligação total, ligação não específica e ligandos.

18. As placas de microtitulação de 96 poços são preparadas de acordo com o quadro 2, com 3 replicados por concentração de [^{3}H]17β-estradiol. O quadro 3 apresenta exemplos da distribuição de volumes do [^{3}H]17β-estradiol, 17β--estradiol não marcado, tampão e recetor.

Quadro 2

Configuração da placa de microtitulação no ensaio de ligação por saturação

	1 (*)	2 (*)	3 (*)	4 (*)	5 (*)	6 (*)	7 (*)	8 (*)	9 (*)	10	11 (**)	12 (**)
	Para medição de TB			Para medição de NSB			Apenas para determinação do ligando quente				Diluições de E2 não rotuladas para as colunas de placas 4--6	Diluições de [^{3}H]E2 para as colunas de placas 1-9
A	0,0313 nM [^{3}H] E2+ ER			0,0313 nM [^{3}H] E2+ 0,0625 μM E2+ ER			0,0313 nM				0,625 μM	0,313 nM
B	0,0625 nM [^{3}H] E2+ ER			0,0625 nM [^{3}H] E2+ 0,125 μM E2+ ER			0,0625 nM				1,25 μM	0,625 nM
C	30,125 nM [^{3}H] E2+ ER			0,125 nM [^{3}H] E2+ 0,25 μM E2+ ER			0,125 nM				2,5 μM	1,25 nM
D	0,250 nM [^{3}H] E2+ ER			0,250 nM [^{3}H] E2+ 0,5 μM E2+ ER			0,250 nM				5 μM	2,5 nM
E	0,50 nM [^{3}H] E2+ ER			0,50 nM [^{3}H] E2+ 1 μM E2+ ER			0,50 nM				10 μM	5 nM
F	1,00 nM [^{3}H] E2+ ER			1,00 nM [^{3}H] E2+ 2 μM E2+ ER			1,00 nM				20 μM	10 nM
G	2,00 nM [^{3}H] E2+ ER			2,00 nM [^{3}H] E2+ 4 μM E2+ ER			2,00 nM				40 μM	20 nM
H	4,00 nM [^{3}H] E2+ ER			4,00 nM [^{3}H] E2+ 8 μM E2+ ER			4,00 nM				80 μM	40 nM

TB: ligação total
NSB: ligação não específica
[^{3}H] E2: [^{3}H]17β-estradiol
E2: 17β-estradiol não marcado
(*) As concentrações indicadas neste caso são as concentrações finais em cada poço.
(**) As diluições de E2 e [^{3}H]E2 não marcados podem ser preparadas numa placa diferente.

▼M8

Quadro 3

Volumes de reagente para a placa de microtitulação para saturação

Número da coluna		1	2	3	4	5	6	7 (*)	8 (*)	9 (*)
Etapas de preparação		Poços TB			Poços NSB			Apenas ligando		
Volume dos componentes para os poços de reação acima e ordem de adição	Tampão	60 µl			50 µl			90 µl		
	E2 não marcado da coluna 11 do quadro 2	—			10 µl			—		
	[3H] E2 da coluna 12 do quadro 2	10 µl			10 µl			10 µl		
	hrERα	30 µl			30 µl			-		
Volume total de reação		100 µl			100 µl			100 µl		
Incubação		**REAÇÃO APÓS 2 HORAS DE INCUBAÇÃO**						Quantificação da radioatividade imediatamente após a preparação. Sem incubação		
Tratamento com 0,4 % DCC		Sim			Sim			**N.º**		
Volume de 0,4 % DCC		100 µl			100 µl			-		
Filtração		Sim			Sim			N.º		
MEDIÇÃO DO DPMS										
Quantificação do volume adicionado ao cocktail de cintilação		100 µl (**)			100 µl (**)			50 µl		

(*) Se um LSC para microplacas for utilizado para medição de dpms, não é adequado preparar o ligando quente isolado na mesma placa de ensaio dos poços de TB e NSB. O ligando quente isolado deve ser preparado numa placa diferente.

(**) Se a centrifugação for utilizada para separar o DCC, 50 µl do sobrenadante devem ser medidos pelo LSC, a fim de evitar a contaminação do DCC.

19. As placas de microtitulação para determinação da ligação total e não específicas devem ser incubadas à temperatura ambiente (22 °C a 28 °C) durante duas horas.

Medição da ligação do [^{3}H]17β-estradiol à hrERα

20. Após o período de incubação de duas horas o [3H]17β-estradiol ligado ao hrERα deve ser separada do [^{3}H]17β-estradiol livre pela adição de 100 µl de uma suspensão em gelo frio de 0,4 % DCC aos poços. As placas devem então ser colocadas em gelo durante 10 minutos, devendo a mistura de reação e a suspensão de DCC ser filtradas por meio de transferência para um filtro de placas de microtitulação, para remover o DCC. Adicionar depois 100 µl do filtrado ao fluido de cintilação em frascos de LSC para determinação da desintegração por minuto (dpms) e por frasco por contagem da cintilação em meio líquido.

▼M8

21. Em alternativa, se não estiver disponível um filtro de microplacas, a extração do DCC pode ser feita por centrifugação. Para evitar qualquer contaminação dos poços por contacto com o DCC, 50 µl do sobrenadante contendo [^{3}H]17β-estradiol ligado ao hrERα devem ser retirados com extremo cuidado.

22. O ligando quente isolado é usado para determinar a desintegração por minuto (dpm) do [^{3}H]17β-estradiol adicionado aos poços. A radioatividade deve ser quantificada imediatamente após a preparação. Estes poços não devem ser incubados e não devem ser tratados com a suspensão DCC, mas o seu conteúdo deve ser diretamente adicionado ao fluido de cintilação. Estas medidas demonstram quanto [^{3}H]17β-estradiol em foi adicionado a cada conjunto de poços para a ligação total e para a ligação não específica.

Ensaio de ligação competitiva

23. O ensaio de ligação competitiva mede a ligação de uma única concentração de [^{3}H]17β-estradiol na presença de concentrações crescentes de um produto químico em estudo. Devem utilizar-se três replicados paralelos de cada concentração numa mesma série de ensaios. Além disso, devem efetuar-se três ensaios não paralelos para cada produto químico ensaiado. O ensaio deve ser configurado com uma ou várias placas de microtitulação de 96 poços.

Controlos

24. Durante a realização do ensaio, devem ser incluídos em cada experiência o solvente e os controlos paralelos (isto é, estrogénios de referência, ligante fraco e não ligante). As curvas de concentração inteiras para os estrogénios e os controlos de referência (por exemplo, ligante fraco e não ligante) devem ser utilizadas numa única placa em cada série de ensaios. Todas as outras placas devem conter: (i) uma concentração elevada (deslocamento máximo, ou seja, deslocamento quase total do ligando com marcação radioativa) e média (aproximadamente a IC_{50}) de cada um dos E2 e ligante fraco em triplicado; (ii) controlo do solvente e ligação não específica, cada um, no mínimo, em triplicado. Os procedimentos para a preparação do tampão de ensaio [^{3}H]17β-estradiol, do hrERα e das soluções do produto químico em estudo são descritos de forma aprofundada no protocolo CERI (2).

Controlo do solvente

25. O controlo do solvente indica que o solvente não interage com o sistema de ensaio e mede a ligação total (TB). O DMSO é o solvente preferencial. Em alternativa, se a concentração mais elevada do produto químico em estudo não for solúvel em DMSO, pode ser utilizado etanol. A concentração de DMSO nos poços finais deve ser de 2,05 % e poderá ser aumentada para 2,5 % em caso de ausência de solubilidade do produto químico em estudo. As concentrações de DMSO acima de 2,5 % não devem ser utilizadas devido à interferência das concentrações mais elevadas de solvente no ensaio. Para ensaiar os produtos químicos que não são solúveis em DMSO, mas são solúveis em etanol, pode ser utilizado um máximo de 2 % de etanol no ensaio sem interferência.

Controlo do tampão

26. O controlo do tampão (BC) não deve conter solvente nem produto químico em estudo, mas deve conter todos os outros componentes do ensaio. Os resultados do controlo do tampão são comparados com o controlo do solvente, para verificar se o solvente utilizado não afeta o sistema de ensaio.

▼M8

Ligante forte (estrogénio de referência)

27. O 17β-estradiol (n.º CAS 50-28-2) é o ligando endógeno e liga-se com elevada afinidade ao ER de subtipo alfa. Deve preparar-se uma curva padrão com 17β-estradiol não marcado para cada ensaio de ligação competitiva do hrERα, a fim de se proceder a uma avaliação da variabilidade entre ensaios realizados no mesmo laboratório. Devem ser preparadas oito soluções do 17β-estradiol não marcado em DMSO e no tampão de ensaio, com concentrações finais dos poços a utilizar na curva normal espaçada do seguinte modo: 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, $10^{-8,5}$, 10^{-9}, $10^{-9,5}$, 10^{-10}, 10^{-11}M. A maior concentração de 17β–estradiol (1 μM) não marcado deve ser o indicador de ligação não específico. Esta concentração distingue-se pelo rótulo «NSB» no quadro 4, embora também faça parte da curva-padrão.

Ligante fraco

28. Para demonstrar a sensibilidade de cada experiência e permitir uma avaliação da variabilidade ao longo do tempo, deve ser incluído um ligante fraco [noretinodrel (n.º CAS 68-23-5) ou noretinodrona (n.º CAS 68-22-4)]. Devem ser preparadas oito soluções de ligante fraco em DMSO e em tampão de ensaio, com as seguintes concentrações finais nos poços: $10^{-4,5}$, $10^{-5,5}$, 10^{-6}, $10^{-6,5}$, 10^{-7}, $10^{-7,5}$, 10^{-8} e 10^{-9} M.

Não ligante

29. O octiltrietoxissilano (OTES, n.º CAS 2943-75-1) deve ser utilizado como controlo negativo (não ligante), que garante que o ensaio permite detetar os produtos químicos em estudo que não se ligam ao hrERα. Devem ser preparadas oito soluções do não ligante em DMSO e tampão de ensaio, com as seguintes concentrações finais nos poços: 10^{-3}, $10^{3}10^{-4}$, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9}, 10^{-10} M. O ftalato de di-*n*-butilo (DBP, n.º CAS 84-72-2) pode ser usado como uma alternativa não ligante, mas apenas ensaiado até 10^{-4} M. Demonstrou-se que a solubilidade máxima do DBP no ensaio é de 10^{-4} $M^{4}M$.

Concentração do hrERα

30. Deve ser utilizada a quantidade de recetor que dá um valor específico de ligação de 40±10 % (ver pontos 12-13 do apêndice 3). A solução hrERα deve ser preparada por diluição do hrERα funcional em tampão gelo frio imediatamente antes do uso.

[^{3}H]17β-estradiol

31. A concentração final de [^{3}H]17β-estradiol nos poços deve ser de 0,5 nM.

Produtos químicos em estudo

32. Em primeiro lugar, é necessário realizar um ensaio de solubilidade para determinar o limite de solubilidade de cada produto químico em estudo e identificar a gama de concentrações a utilizar na condução do protocolo de ensaio. O limite de solubilidade de cada substância química de ensaio deve ser determinado inicialmente no solvente e posteriormente confirmado em condições de ensaio. A concentração final estudada no ensaio não deve exceder 1 mM. O ensaio de determinação da gama inclui um controlo do solvente, juntamente com, pelo menos, 8 diluições sequenciais, com início na concentração máxima aceitável (por exemplo: 1 mM ou menos, com base no limite de solubilidade) e a presença de ligeira turbidez ou precipitado (ver também o ponto Apêndice 35). Uma vez determinada a gama de concentrações a ensaiar, o produto químico em estudo deve ser ensaiado utilizando

▼M8

curvas de intervalos de concentrações de 8 log, espaçadas conforme definido no ensaio de determinação de gama anterior. As concentrações ensaiadas na segunda e na terceira experiências devem ser novamente ajustadas, de modo a caracterizar melhor a curva concentração-resposta, se necessário.

33. As diluições do produto químico em estudo devem ser preparadas no solvente adequado (ver ponto 25 do apêndice 3). Se a concentração mais elevada do produto químico em estudo não for solúvel nem em DMSO nem em etanol e se a introdução de um novo solvente implicar uma concentração de solvente no tubo final superior ao limite aceitável, a concentração mais elevada pode ser reduzida para a concentração imediatamente inferior. Neste caso, pode ser acrescentada uma concentração adicional na extremidade inferior da série de concentrações. As outras concentrações das séries devem permanecer inalteradas.

34. As soluções do produto químico em estudo devem ser monitorizadas de perto quando adicionadas ao poço de ensaio, uma vez que o produto químico em estudo precipitar para fora do poço. Os dados relativos a todos os poços que contenham precipitado não devem ser tidos em conta e os respetivos motivos de exclusão devem ser anotados.

35. Se houver informação prévia, de outras fontes, que forneçam um $\log(IC_{50})$ de um produto químico em estudo, pode ser conveniente espaçar as diluições de forma geométrica, mais perto do $\log(IC_{50})$ esperado (ou seja, 0,5 unidades logarítmicas em torno do $\log(IC_{50})$ esperado. Os resultados finais deve refletir a extensão suficiente das concentrações para os dois lados do $\log(IC_{50})$, incluindo o «topo» e a «base», de modo a que a curva de ligação possa ser adequadamente caracterizada.

Organização da placa de ensaio

36. Devem ser preparadas placas de microtitulação marcadas, tendo em conta as incubações sêxtuplas, com códigos para o controlo do solvente, a concentração mais elevada do estrogénio de referência, que serve igualmente como indicador de ligação não específica (NSB), o controlo do tampão e incubações em triplicado de cada uma das oito concentrações do controlo não ligante (octiltrietoxissilano), as sete concentrações mais baixas do estrogénio de referência, as oito concentrações das doses do ligante fraco (noretinodrel ou noretinodrina) e as oito concentrações de cada produto químico em estudo (TC). No quadro 4 figura um exemplo do diagrama da placa para as curvas de concentração inteiras dos estrogénios de referência e do controlo. São utilizadas placas de microtitulação adicionais para os produtos químicos em estudo e devem incluir controlos da placa, nomeadamente 1), uma concentração elevada (deslocamento máximo) e média (aproximadamente a IC_{50}) de cada um dos E2 e ligante fraco em triplicado; 2) controlo do solvente (como ligante total) e ligação não específica, cada uma sextuplicada (quadro 5). O apêndice 3.3 apresenta um exemplo de folha de cálculo com um esquema de configuração das placas de microtitulação com três produtos químicos em estudo desconhecidos para o ensaio de ligação competitiva. As concentrações indicadas na folha de cálculo, bem como nos quadros 4 e 5, referem-se às concentrações finais utilizadas em cada ensaio. A concentração máxima para E2 deve ser 1×10^{-7} M e, para o ligante fraco, deve ser usada a concentração mais elevada utilizada para o ligante fraco na placa 1. A concentração IC_{50} deve ser determinada pelo laboratório com base na sua base de dados históricos de controlo. Prevê-se que este valor seja semelhante ao observado nos estudos de validação (ver quadro 1).

▼**M8**

Quadro 4

Configuração das placas de microtitulação para o ensaio de ligação competitiva [1] [2]**, curvas de concentração inteiras para os estrogénios e os controlos de referência (placa 1)**

	1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*	*9*	*10*	*11*	*12*
	Controlo do tampão e controlo positivo (E2)			Fracamente positivo Noretino-drel			Controlo negativo (OTES)			TB e NSB		
A	Vazio (*)			1×10^{-9} M			1×10^{-10} M			TB (controlo de solvente) (2,05 % DMSO)		
B	E2 (1×10^{-11} M)			1×10^{-8} M			1×10^{-9} M					
C	E2 (1×10^{-10} M)			$1\times10^{-7,5}$ M			1×10^{-8} M			NSB (E2 10^{-6} M)		
D	E2 ($1\times10^{-9,5}$ M)			1×10^{-7} M			1×10^{-7} M					
E	E2 (1×10^{-9} M)			$1\times10^{-6,5}$ M			1×10^{-6} M			Tampão de controlo		
F	E2 ($1\times10^{-8,5}$ M)			1×10^{-6} M			1×10^{-5} M					
G	E2 (1×10^{-8} M)			$1\times10^{-5,5}$ M			1×10^{-4} M			Vazio (para quente) (**)		
H	E2 (1×10^{-7} M)			$1\times10^{-4,5}$ M			1×10^{-3} M					

([1]) Amostra preparada para a placa de microtitulação normal, a utilizar em todas as experiências.
([2]) Note que esta placa de microtitulação é feita utilizando as diluições feitas na placa de diluição descrita para as normas referidas nas secções anteriores.
Neste exemplo, o ligando fraco é o noretinodrel (NE)
(*) Vazio verdadeiro, poço não utilizado
(**) Vazio, não utilizado durante a incubação, mas utilizado para confirmar a radioatividade total acrescentada.

Quadro 5

Materiais de simulação para a produção de placas vinculativas, placas adicionais vinculativas, placas adicionais para produtos químicos de ensaio (TC) e placas de controlo

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Produto químico em estudo-1 (TC-1)			Produto químico em estudo-2 (TC-2)			Produto químico em estudo-3 (TE-3)			Controlos		
A	TC-1 (1×10^{-10} M)			TC-2 (1×10^{-10} M)			TC-3 (1×10^{-10} M)			E2 (1×10^{-7}M)		
B	TC-1 (1×10^{-9} M)			TC-2 (1×10^{-9} M)			TC-3 (1×10^{-9} M)			E2 (IC_{50})		
C	TC-1 (1×10^{-8} M)			TC-2 (1×10^{-8} M)			TC-3 (1×10^{-8} M)			NE ($1\times10^{-4,5}$M)		
D	TC-1 (1×10^{-7} M)			TC-2 (1×10^{-7} M)			TC-3 (1×10^{-7} M)			NE (IC_{50})		
E	TC-1 (1×10^{-6} M)			TC-2 (1×10^{-6} M)			TC-3 (1×10^{-6} M)			NSB (E2 10^{-6} M)		
F	TC-1 (1×10^{-5} M)			TC-2 (1×10^{-5} M)			TC-3 (1×10^{-5} M)					
G	TC-1 (1×10^{-4} M)			TC-2 (1×10^{-4} M)			TC-3 (1×10^{-4} M)			TB (controlo de solvente)		
H	TC-1 (1×10^{-3} M)			TC-2 (1×10^{-3} M)			TC-3 (1×10^{-3} M)					

Neste exemplo, o ligando fraco é o noretinodrel (NE)

▼M8

Realização do ensaio de ligação competitiva

37. Com exceção dos poços destinados a ligação total e dos vazios (para quente), conforme ao quadro 6, introduzir em cada poço 50 µl de tampão de ensaio e misturar com 10 µl do controlo do solvente, estrogénio de referência (E2), ligante fraco, não ligante e produto químico em estudo, respetivamente, 10 µl de uma solução a 5 nM de [3H]17β-estradiol. Em seguida, adicionar 30 µl de solução do recetor gelo frio a cada placa e misturar delicadamente. A solução de hrERIα deve ser o último reagente a ser adicionado. As placas de microtitulação do ensaio devem ser incubadas à temperatura ambiente (22-28 °C) durante 2 horas.

Quadro 6

Quantidade de componentes de ensaio para o ensaio de ligação competitiva nos hrER, placas microtituladoras

Etapas de preparação		Outros que não os poços de TB	Poços de TB	Vazio (para quente)
Volume dos componentes para os poços de reação acima e ordem de adição	Tampão de ensaio à temperatura ambiente	50 µl	60 µl	90 µl
	E2 não marcado, ligante fraco não ligante, solventes e produtos químicos de ensaio (*)	10 µl	—	—
	[3H]17β-estradiol para concentração final de 0,5 nM (i.e. 5 nM)	10 µl	10 µl	10 µl
	Concentração de hrERα conforme determinada (ver pontos 12-13)	30 µl	30 µl	—
Volume total em cada poço		100 µl	100 µl	100 µl

(*) preparado corretamente para obter uma concentração final dentro da concentração aceitável do solvente.

38. Deve proceder-se à quantificação do valor da ligação do [^{3}H]17β-estradiol ao hrERα, após a separação do [^{3}H]17β-estradiol ligado ao hrERα do [^{3}H]17β--estradiol livre mediante a adição de 100 µl de suspensão de DCC gelo frio a cada poço, conforme descrito nos pontos 21 a 23 do apêndice 3 para o ensaio de ligação por saturação.

39. Os poços G10-12 e H10-12, identificados como vazios (para quente) no quadro 4, representam o dpms do [^{3}H]]17β-estradiol marcado em 10 µl. A alíquota de 10 µl deve ser diretamente adicionada ao fluido de cintilação.

Critérios de aceitabilidade

Ensaio de ligação por saturação

40. A curva de ligação específica deve atingir um patamar elevado à medida em que forem sendo utilizadas concentrações crescentes de [^{3}H]17β-estradiol, indicando saturação do hrERα com o ligando.

41. A ligação específica a 0,5 nM de [^{3}H]17β-estradiol deve situar-se na gama aceitável, entre 30 % e 50 % da média da radioatividade total medida adicionada ao longo nas diferentes séries de ensaio. São aceitáveis pequenos desvios a este intervalo, mas se as séries de ensaios se situarem permanentemente fora deste intervalo de variação, ou se uma séries de ensaios estiver consideravelmente fora deste intervalo, a concentração de proteínas deve ser ajustada, repetindo-se o ensaio de saturação.

▼M8

42. Os dados devem produzir um diagrama linear de Scatchard.

43. A ligação não específica não deve ser excessiva. O valor da ligação não específica deve, normalmente, ser < 35 % da ligação total. No entanto, o rácio pode, ocasionalmente, ultrapassar este limite quando é medido um dpm muito baixo para a concentração mais baixa de e 17β-estradiol com marcação radioativa do β-estradiol.

Ensaio de ligação competitiva

44. O aumento das concentrações do 17β-estradiol não marcado deve deslocar o [^{3}H]17β-estradiol do recetor de forma compatível com uma ligação competitiva num sítio.

45. O valor de IC_{50} para o estrogénio de referência (i.e., 17β-estradiol) deve ser aproximadamente igual à concentração molar de [^{3}H]17β-estradiol mais o Kd determinado a partir do ensaio de saturação da ligação.

46. A ligação específica total deve estar consistentemente dentro de um intervalo aceitável de 40±10 % quando a concentração média de radioatividade total medida adicionada a cada poço for de 0,5 nM nas séries de ensaios. São aceitáveis pequenos desvios a este intervalo, mas se as séries de ensaios se situarem permanentemente fora deste intervalo de variação, ou se uma séries de ensaios estiver consideravelmente fora deste intervalo, a concentração de proteínas deve ser ajustada.

47. O solvente não deve alterar a sensibilidade ou a reprodutibilidade do ensaio. Os resultados do controlo do solvente (poços de TB) são comparados com o controlo de tampão, a fim de verificar se o solvente utilizado não afeta o sistema de ensaio. Os resultados do TB e do controlo da solução-tampão devem ser comparáveis se não houver nenhum efeito do solvente no ensaio.

48. O não ligante não deve deslocar mais de 25 % do [^{3}H]17β-estradiol do hrERα quando ensaiado até 10^{-3} M (OTES) ou 10^{-4} M (DBP).

49. Foram desenvolvidos critérios de desempenho para os estrogénios de referência e dois ligantes fracos (por exemplo, noretinodrel, noretindrona) com base nos dados do estudo de validação do ensaio de ligação CERIhrER (anexo N da referência 2). A média de 95 % de intervalos de confiança é fornecida para o DP médio (n) de todos os controlos em quatro laboratórios que participaram no estudo de validação. Foram calculados intervalos de confiança de 95 % para os parâmetros de ajustamento da curva [isto é, topo, base, curva de Hill e log(IC_{50})]) para os estrogénios de referência e os ligantes fracos, e o $\log_{10}$ (RBA)Log_{10}RBA dos ligantes fracos em relação aos estrogénios de referência. O quadro 1 apresenta os intervalos previstos para os parâmetros de ajustamento da curva que podem ser utilizados como critérios de desempenho. Na prática, o IC_{50} pode variar ligeiramente em função dos valores de Kd obtidos experimentalmente a partir da preparação de recetor e da concentração de ligando utilizados para o ensaio.

50. Não foram definidos critérios de desempenho para os parâmetros de ajustamento da curva em relação aos produtos químicos em estudo, devido à grande variedade de produtos químicos em estudo existentes e à variação das principais afinidades e dos resultados (p. ex., curva inteira, curva parcial,

▼M8

sem ajustamento de curva). Contudo, devem ser utilizados critérios profissionais aquando da avaliação dos resultados de cada série de ensaios para um produto químico em estudo. Deve ser utilizada uma gama de concentrações do produto químico em estudo suficiente para definir claramente o topo (por exemplo, 90-100 % de ligação) da curva de ligação competitiva. A variabilidade dos replicados para cada concentração do produto químico em estudo, bem como entre as 3 séries não paralelas, deve ser razoável e cientificamente aceitável. Os controlos de cada ciclo para um produto químico em estudo devem abordar as medidas de desempenho comunicadas para este ensaio CERI e ser coerentes com os dados históricos de controlo de cada laboratório.

ANÁLISE DOS DADOS

Ensaio de ligação por saturação

51. São medidas as ligações totais e as ligações não específicas. A partir destes valores, a ligação específica de concentrações crescentes de [^{3}H]17β-estradiol em condições de equilíbrio é calculada subtraindo-se a ligação não específica do total. Um gráfico que apresente a ligação específica *versus* a concentração de [^{3}H]17β-estradiol deve atingir um plano para o indicativo máximo específico da ligação por saturação do hrERα [^{3}-17H]β-estradiol. Além disso, a análise dos dados deve documentar a ligação do [^{3}H]17β-estradiol a um único ponto de ligação de alta afinidade. As ligações não específicas, totais e específicas devem ser visíveis numa curva de ligação por saturação. Uma análise mais aprofundada destes dados deve utilizar uma análise de regressão não linear (ex., BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) com uma apresentação final dos dados de acordo com Scatchard.

52. A análise de dados deve determinar o $B_{máx}$ e a Kd a partir, unicamente dos dados relativos à ligação total, partindo do pressuposto de que a ligação não específica é de linear, salvo se for justificada a utilização de outro método. Quando se determinar a melhor adequação, deve utilizar-se uma regressão sólida, a menos que seja apresentada uma justificação. Deve ser indicado método escolhido para uma regressão sólida. A correção da depleção de ligando (por exemplo, utilizando o método de Swillens 1995) deve ser sempre utilizada na determinação de $B_{máx}$ e Kd a partir dos dados da ligação por saturação.

Ensaio de ligação competitiva

53. A curva de ligação competitiva é representada como a ligação específica do [^{3}H]17β-estradiol *versus* a concentração [$\log_{10}$ (unidades)] do concorrente. A concentração do produto químico em estudo que inibe 50 % da ligação máxima específica do [^{3}H]17β-estradiol é IC_{50}.

54. As estimativas de log(IC_{50}) para os controlos positivos (por exemplo, estrogénios de referência e ligantes fracos) devem ser determinadas com recurso a um *software* de ajustamento não linear de ajustamento adequado, a fim de se adaptar à equação de quatro parâmetros de Hill (p. ex., BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995). Em geral, o topo, a base, a curva e o log(IC_{50}) devem ser mantidos inalterados quando se ajustam as curvas. Quando se determinar a melhor adequação, deve utilizar-se uma regressão sólida, a menos que seja apresentada uma justificação. Não devem ser feitas correções para a depleção do ligando. Após a análise inicial, cada curva de ligação deve ser avaliada de modo a garantir a devida adequação ao modelo. A afinidade de ligação relativa (RBA) do ligando fraco deve ser calculada como percentagem do log(IC_{50}) para o ligante fraco em relação ao log(IC_{50}) para o 17β-estradiol. Os resultados dos controlos positivos e do controlo do não ligante devem ser avaliados de acordo com as medidas do desempenho do ensaio constantes dos pontos 44 a 49 do presente apêndice 3.

▼M8

55. Os dados relativos a todos os produtos químicos em estudo devem ser analisados através de uma abordagem por etapas, para garantir que os dados são devidamente analisados e que cada ligação competitiva é devidamente classificada. Recomenda-se que cada série de ensaios para um produto químico em estudo seja inicialmente submetida a uma análise normalizada de dados idêntica à utilizada para os estrogénios de referência e para controlos de ligantes fracos (ponto 54 do presente apêndice 3). Uma vez concluída, deve ser efetuada uma avaliação técnica dos parâmetros de ajustamento da curva, bem como uma análise visual do grau de adequação dos dados à curva de ligação competitiva gerada para cada série de ensaios. Durante esta avaliação técnica, as observações de uma diminuição dependente da concentração do [3H]17β-estradiol especificamente ligado, da baixa variabilidade entre os replicados técnicos em cada concentração do produto químico em estudo e da coerência dos parâmetros de ajustamento entre as três séries de ensaios constituem uma boa indicação de que a análise de ensaios e de dados foi realizada de forma adequada.

Interpretação dos dados

56. Caso se cumpram todos os critérios de aceitabilidade, o produto químico em estudo é considerado um ligante para o hrERα se for possível ajustar uma curva ligação e o ponto mais baixo da curva de resposta dentro da gama de dados for inferior a 50 % (figura 1).

57. O produto químico em estudo é considerado como não ligante se, cumpridos todos os critérios de aceitabilidade:

— For possível ajustar uma curva de ligação e o ponto mais baixo da curva de resposta dentro da gama de dados for superior a 75 %, ou

— Não for possível ajustar uma curva de ligação e a média percentual mais baixa não ajustada entre os grupos de concentração dos dados for superior a 75 %.

58. Os produtos químicos em estudo são considerados equívocos se nenhuma das condições acima referidas estiver preenchida (por exemplo, o ponto mais baixo da curva de resposta ajustada situa-se entre 76 e 51 %).

Quadro 7

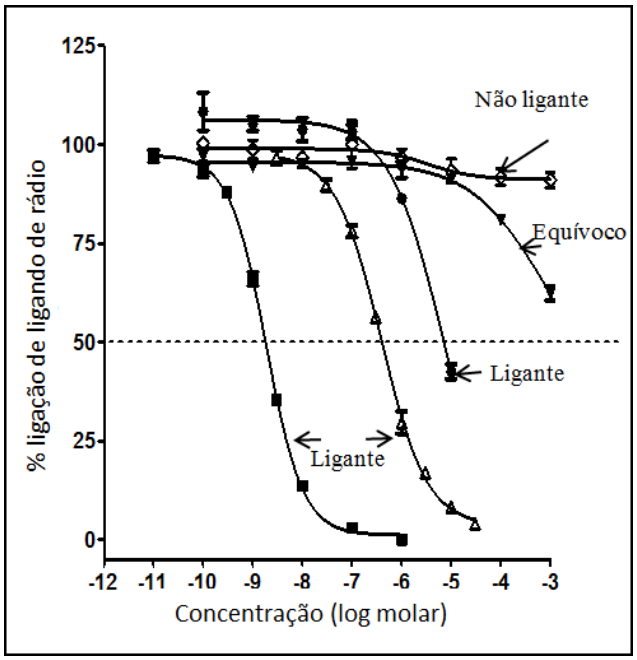
Critérios para classificação com base numa curva de ligação competitiva para um produto químico em estudo

Classificação	Critérios
Ligante[a]	Uma curva de ligação pode ser ajustada. O **ponto mais baixo na curva de resposta dentro da gama de dados é inferior a 50 %**.
Não ligante[b]	Se for possível ajustar a curva de ligação, o **ponto mais baixo da curva de resposta dentro da gama de dados é superior a 75 %**. Se não for possível ajustar a curva de ligação, a **média percentual mais baixa não ajustada entre os grupos de concentração nos dados é superior a 75 %**.
Inconclusivo[c]	Qualquer produto químico em estudo que não seja ligante nem não ligante. (Por exemplo, o ponto mais baixo da curva de resposta ajustada situa-se entre 76 e 51 %).

▼M8

Figura 1

Exemplos de classificação de produtos químicos em estudo por meio de uma curva de ligação competitiva



59. As várias séries de ensaios realizados num laboratório para um produto químico em estudo são combinadas através da atribuição de valores numéricos a cada série de ensaios e fazendo a média das diferentes séries, como se indica no quadro 8. Os resultados para as séries combinadas em cada laboratório são comparados com a classificação prevista para cada produto químico em estudo.

Quadro 8

Método de classificação do produto químico em estudo utilizando múltiplas séries de ensaios

Para atribuir valor a cada série de ensaios:	
Classificação	**Valor numérico**
Ligante	2
Inconclusivo	1
Não ligante	0
Para classificar a média dos valores numéricos das diferentes séries de ensaios:	
Classificação	**Valor numérico**
Ligante	Média ≥ 1,5
Inconclusivo	0,5 ≤ média < 1,5
Não ligante	Média < 0,5

RELATÓRIO DO ENSAIO

60. Ver ponto 24 de «COMPONENTES DO ENSAIO DE LIGAÇÃO hrER» do presente método de ensaio.

▼**M8**

Apêndice 3.1

LISTA DE TERMOS

DCC: carvão revestido com dextrose.

[^{3}H]E2: 17β-estradiol com marcação radioativa por trítio.

E2: 17β-estradiol não marcado (inerte).

hrERα: recetor alfa de estrogénio recombinante humano (domínio de ligação do ligando).

Replicado: um ou vários poços que contêm o mesmo conteúdo com as mesmas concentrações e que são objeto de ensaios paralelos numa única série de ensaios. Neste protocolo, cada concentração do produto químico em estudo é ensaiada em triplicado; isto é, existem três replicados que são ensaiados simultaneamente em cada concentração do produtos químico em estudo.

Série de ensaios: conjunto completo de poços de placas de microtitulação que fornece todas as informações necessárias para caracterizar a ligação de um produto químico em estudo ao hrERα (viz., total [^{3}H]17β-estradiol adicionado ao poço, ligação máxima do [^{3}H]17β-estradiol ao hrERα ligação não específica e ligação total em diferentes concentrações do produto químico em estudo). Uma série de ensaio pode consistir em apenas um poço de ensaio (ou seja, replicado) por concentração; contudo, dado que este protocolo requer que os ensaios sejam realizados em triplicado, uma série de ensaios consiste em três poços por concentração. Além disso, este protocolo requer três séries de ensaio independentes (ou seja, não paralelas) por produto químico.

Tampão de ensaio: 10 mM de Tris-HCl, pH 7,4, contendo 1 mM de EDTA, EGTA 1 mM, 1 mM NaVO3, 10 % de glicerol, 0,2 mM de leupeptina, 1 mM ditiotritol e 10 mg/ml de albumina sérica bovina.

▼**M8**

Apêndice 3.2

CONFIGURAÇÃO DO ENSAIO DE LIGAÇÃO COMPETITIVA

Placa	Posição	Replicado	Tipo de poço	Código do poço	Código de concentração	Concentração inicial do concorrente (M)	Solução de reserva de hrER (µl)	Volume do tampão (µl)	Volume (µl) do traçador (E2 quente)	Volume a partir da placa de diluição (µl)	Volume final (µl)	Concentração final do concorrente (M)
S	A1	1	Em branco	BK	BK1	—	—	—	—	—	—	—
S	A2	2	Em branco	BK	BK2	—	—	—	—	—	—	—
S	A3	3	Em branco	BK	BK3	—	—	—	—	—	—	—
S	B1	1	E2 frio	S	S1	1,,00E-10	30	50	10	10	100	1,,0E-11
S	B2	2	E2 frio	S	S1	1,,00E-10	30	50	10	10	100	1,,0E-11
S	B3	3	E2 frio	S	S1	1,,00E-10	30	50	10	10	100	1,,0E-11
S	C1	1	E2 frio	S	S2	1,,00E-09	30	50	10	10	100	1,,0E-10
S	C2	2	E2 frio	S	S2	1,,00E-09	30	50	10	10	100	1,,0E-10
S	C3	3	E2 frio	S	S2	1,,00E-09	30	50	10	10	100	1,,0E-10
S	D1	1	E2 frio	S	S3	3,16E-09	30	50	10	10	100	3,,2E-10
S	D2	2	E2 frio	S	S3	3,16E-09	30	50	10	10	100	3,,2E-10
S	D3	3	E2 frio	S	S3	3,16E-09	30	50	10	10	100	3,,2E-10
S	E1	1	E2 frio	S	S4	1,,00E-08	30	50	10	10	100	1,,0E-09
S	E2	2	E2 frio	S	S4	1,,00E-08	30	50	10	10	100	1,,0E-09
S	E3	3	E2 frio	S	S4	1,,00E-08	30	50	10	10	100	1,,0E-09
S	F1	1	E2 frio	S	S5	3,16E-08	30	50	10	10	100	3,,2E-09
S	F2	2	E2 frio	S	S5	3,16E-08	30	50	10	10	100	3,,2E-09
S	F3	3	E2 frio	S	S5	3,16E-08	30	50	10	10	100	3,,2E-09
S	G1	1	E2 frio	S	S6	1,,00E-07	30	50	10	10	100	1,,0E-08

▼**M8**

Placa	Posição	Replicado	Tipo de poço	Código do poço	Código de concentração	Concentração inicial do concorrente (M)	Solução de reserva de hrER (µl)	Volume do tampão (µl)	Volume (µl) do traçador (E2 quente)	Volume a partir da placa de diluição (µl)	Volume final (µl)	Concentração final do concorrente (M)
S	G2	2	E2 frio	S	S6	1,,00E-07	30	50	10	10	100	1,,0E-08
S	G3	3	E2 frio	S	S6	1,,00E-07	30	50	10	10	100	1,,0E-08
S	H1	1	E2 frio	S	S7	1,,00E-06	30	50	10	10	100	1,,0E-07
S	H2	2	E2 frio	S	S7	1,,00E-06	30	50	10	10	100	1,,0E-07
S	H3	3	E2 frio	S	S7	1,,00E-06	30	50	10	10	100	1,,0E-07
S	A4	1	Noretinodrel	NE	WP1	1,,00E-08	30	50	10	10	100	1,,0E-09
S	A5	2	Noretinodrel	NE	WP1	1,,00E-08	30	50	10	10	100	1,,0E-09
S	A6	3	Noretinodrel	NE	WP1	1,,00E-08	30	50	10	10	100	1,,0E-09
S	B4	1	Noretinodrel	NE	WP2	1,,00E-07	30	50	10	10	100	1,,0E-08
S	B5	2	Noretinodrel	NE	WP2	1,,00E-07	30	50	10	10	100	1,,0E-08
S	B6	3	Noretinodrel	NE	WP2	1,,00E-07	30	50	10	10	100	1,,0E-08
S	C4	1	Noretinodrel	NE	WP3	3,16E-07	30	50	10	10	100	3,,2E-08
S	C5	2	Noretinodrel	NE	WP3	3,16E-07	30	50	10	10	100	3,,2E-08
S	C6	3	Noretinodrel	NE	WP3	3,16E-07	30	50	10	10	100	3,,2E-08
S	D4	1	Noretinodrel	NE	WP4	1,,00E-06	30	50	10	10	100	1,,0E-07
S	D5	2	Noretinodrel	NE	WP4	1,,00E-06	30	50	10	10	100	1,,0E-07
S	D6	3	Noretinodrel	NE	WP4	1,,00E-06	30	50	10	10	100	1,,0E-07
S	E4	1	Noretinodrel	NE	WP5	3,16E-06	30	50	10	10	100	3,,2E-07
S	E5	2	Noretinodrel	NE	WP5	3,16E-06	30	50	10	10	100	3,,2E-07
S	E6	3	Noretinodrel	NE	WP5	3,16E-06	30	50	10	10	100	3,,2E-07

▼**M8**

Placa	Posição	Replicado	Tipo de poço	Código do poço	Código de concentração	Concentração inicial do concorrente (M)	Solução de reserva de hrER (µl)	Volume do tampão (µl)	Volume (µl) do traçador (E2 quente)	Volume a partir da placa de diluição (µl)	Volume final (µl)	Concentração final do concorrente (M)
S	F4	1	Noretinodrel	NE	WP6	1,,00E-05	30	50	10	10	100	1,,0E-06
S	F5	2	Noretinodrel	NE	WP6	1,,00E-05	30	50	10	10	100	1,,0E-06
S	F6	3	Noretinodrel	NE	WP6	1,,00E-05	30	50	10	10	100	1,,0E-06
S	G4	1	Noretinodrel	NE	WP7	3,16E-05	30	50	10	10	100	3,,2E-06
S	G5	2	Noretinodrel	NE	WP7	3,16E-05	30	50	10	10	100	3,,2E-06
S	G6	3	Noretinodrel	NE	WP7	3,16E-05	30	50	10	10	100	3,,2E-06
S	H4	1	Noretinodrel	NE	WP8	3,16E-04	30	50	10	10	100	3,,2E-05
S	H5	2	Noretinodrel	NE	WP8	3,16E-04	30	50	10	10	100	3,,2E-05
S	H6	3	Noretinodrel	NE	WP8	3,16E-04	30	50	10	10	100	3,,2E-05
S	A7	1	OTES	N	OTES1	1,,00E-09	30	50	10	10	100	1,,0E-10
S	A8	2	OTES	N	OTES1	1,,00E-09	30	50	10	10	100	1,,0E-10
S	A9	3	OTES	N	OTES1	1,,00E-09	30	50	10	10	100	1,,0E-10
S	B7	1	OTES	N	OTES2	1,,00E-08	30	50	10	10	100	1,,0E-09
S	B8	2	OTES	N	OTES2	1,,00E-08	30	50	10	10	100	1,,0E-09
S	B9	3	OTES	N	OTES2	1,,00E-08	30	50	10	10	100	1,,0E-09
S	C7	1	OTES	N	OTES3	1,,00E-07	30	50	10	10	100	1,,0E-08
S	C8	2	OTES	N	OTES3	1,,00E-07	30	50	10	10	100	1,,0E-08
S	C9	3	OTES	N	OTES3	1,,00E-07	30	50	10	10	100	1,,0E-08
S	D7	1	OTES	N	OTES4	1,,00E-06	30	50	10	10	100	1,,0E-07
S	D8	2	OTES	N	OTES4	1,,00E-06	30	50	10	10	100	1,,0E-07
S	D9	3	OTES	N	OTES4	1,,00E-06	30	50	10	10	100	1,,0E-07
S	E7	1	OTES	N	OTES5	1,,00E-05	30	50	10	10	100	1,,0E-06
S	E8	2	OTES	N	OTES5	1,,00E-05	30	50	10	10	100	1,,0E-06
S	E9	3	OTES	N	OTES5	1,,00E-05	30	50	10	10	100	1,,0E-06

▼**M8**

Placa	Posição	Replicado	Tipo de poço	Código do poço	Código de concentração	Concentração inicial do concorrente (M)	Solução de reserva de hrER (µl)	Volume do tampão (µl)	Volume (µl) do traçador (E2 quente)	Volume a partir da placa de diluição (µl)	Volume final (µl)	Concentração final do concorrente (M)
S	F7	1	OTES	N	OTES6	1,,00E-04	30	50	10	10	100	1,,0E-05
S	F8	2	OTES	N	OTES6	1,,00E-04	30	50	10	10	100	1,,0E-05
S	F9	3	OTES	N	OTES6	1,,00E-04	30	50	10	10	100	1,,0E-05
S	G7	1	OTES	N	OTES7	1,,00E-03	30	50	10	10	100	1,,0E-04
S	G8	2	OTES	N	OTES7	1,,00E-03	30	50	10	10	100	1,,0E-04
S	G9	3	OTES	N	OTES7	1,,00E-03	30	50	10	10	100	1,,0E-04
S	H7	1	OTES	N	OTES8DB-P7	1,,00E-02	30	50	10	10	100	1,,0E-03
S	H8	2	OTES	N	OTES88	1,,00E-02	30	50	10	10	100	1,,0E-03
S	H9	3	OTES	N	OTES8	1,,00E-02	30	50	10	10	100	1,,0E-03
S	A10	1	Ligação total	TB	TB1	—	30	60	10	—	100	—
S	A11	2	Ligação total	TB	TB2	—	30	60	10	—	100	—
S	A12	3	Ligação total	TB	TB3	—	30	60	10	—	100	—
S	B10	4	Ligação total	TB	TB4	—	30	60	10	—	100	—
S	B11	5	Ligação total	TB	TB5	—	30	60	10	—	100	—
S	B12	6	Ligação total	TB	TB6	—	30	60	10	—	100	—
S	C10	1	E2 frio (elevado)	NSB	S1	1,,00E-05	30	50	10	10	100	1,,0E-06
S	C11	2	E2 frio (elevado)	NSB	S2	1,,00E-05	30	50	10	10	100	1,,0E-06
S	C12	3	E2 frio (elevado)	NSB	S3	1,,00E-05	30	50	10	10	100	1,,0E-06
S	D10	4	E2 frio (elevado)	NSB	S4	1,,00E-05	30	50	10	10	100	1,,0E-06
S	D11	5	E2 frio (elevado)	NSB	S5	1,,00E-05	30	50	10	10	100	1,,0E-06

▼**M8**

Placa	Posição	Replicado	Tipo de poço	Código do poço	Código de concentração	Concentração inicial do concorrente (M)	Solução de reserva de hrER (µl)	Volume do tampão (µl)	Volume (µl) do traçador (E2 quente)	Volume a partir da placa de diluição (µl)	Volume final (µl)	Concentração final do concorrente (M)
S	D12	6	E2 frio (elevado)	NSB	S6	1,,00E-05	30	50	10	10	100	1,,0E-06
S	E10	1	Tampão de controlo	BC	BC1	—	—	100	—	—	100	—
S	E11	2	Tampão de controlo	BC	BC2	—	—	100	—	—	100	—
S	E12	3	Tampão de controlo	BC	BC3	—	—	100	—	—	100	—
S	F10	4	Tampão de controlo	BC	BC4	—	—	100	—	—	100	—
S	F11	5	Tampão de controlo	BC	BC5	—	—	100	—	—	100	—
S	F12	6	Tampão de controlo	BC	BC6	—	—	100	—	—	100	—
S	G10 (*)	1	Vazio (para quente)	Quente	H1	—	90	—	10	—	100	—
S	G11 (*)	2	Vazio (para quente)	Quente	H2	—	90	—	10	—	100	—
S	G12 (*)	3	Vazio (para quente)	Quente	H3	—	90	—	10	—	100	—
S	H10 (*)	4	Vazio (para quente)	Quente	H4	—	90	—	10	—	100	—

▼**M8**

Placa	Posição	Replicado	Tipo de poço	Código do poço	Código de concentração	Concentração inicial do concorrente (M)	Solução de reserva de hrER (µl)	Volume do tampão (µl)	Volume (µl) do traçador (E2 quente)	Volume a partir da placa de diluição (µl)	Volume final (µl)	Concentração final do concorrente (M)
S	H11 (*)	5	Vazio (para quente)	Quente	H5	—	90	—	10	—	100	—
S	H12	6	Vazio (para quente)	Quente	H6	—	90	—	10	—	100	—
P1	A1	1	Desconhecido 1	U1	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A2	2	Desconhecido 1	U1	1	1,,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A3	3	Desconhecido 1	U1	1	1,,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	B1	1	Desconhecido 1	U1	2	1,,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B2	2	Desconhecido 1	U1	2	1,,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B3	3	Desconhecido 1	U1	2	1,,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C1	1	Desconhecido 1	U1	3	1,,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C2	2	Desconhecido 1	U1	3	1,,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C3	3	Desconhecido 1	U1	3	1,,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	D1	1	Desconhecido 1	U1	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D2	2	Desconhecido 1	U1	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D3	3	Desconhecido 1	U1	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E1	1	Desconhecido 1	U1	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E2	2	Desconhecido 1	U1	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E3	3	Desconhecido 1	U1	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F1	1	Desconhecido 1	U1	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F2	2	Desconhecido 1	U1	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F3	3	Desconhecido 1	U1	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G1	1	Desconhecido 1	U1	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G2	2	Desconhecido 1	U1	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G3	3	Desconhecido 1	U1	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	H1	1	Desconhecido 1	U1	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H2	2	Desconhecido 1	U1	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03

▼**M8**

Placa	Posição	Replicado	Tipo de poço	Código do poço	Código de concentração	Concentração inicial do concorrente (M)	Solução de reserva de hrER (µl)	Volume do tampão (µl)	Volume (µl) do traçador (E2 quente)	Volume a partir da placa de diluição (µl)	Volume final (µl)	Concentração final do concorrente (M)
P1	H3	3	Desconhecido 1	U1	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	A4	1	Desconhecido 2	U2	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A5	2	Desconhecido 2	U2	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A6	3	Desconhecido 2	U2	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	B4	1	Desconhecido 2	U2	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B5	2	Desconhecido 2	U2	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B6	3	Desconhecido 2	U2	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C4	1	Desconhecido 2	U2	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C5	2	Desconhecido 2	U2	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C6	3	Desconhecido 2	U2	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	D4	1	Desconhecido 2	U2	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D5	2	Desconhecido 2	U2	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D6	3	Desconhecido 2	U2	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E4	1	Desconhecido 2	U2	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E5	2	Desconhecido 2	U2	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E6	3	Desconhecido 2	U2	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F4	1	Desconhecido 2	U2	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F5	2	Desconhecido 2	U2	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F6	3	Desconhecido 2	U2	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G4	1	Desconhecido 2	U2	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G5	2	Desconhecido 2	U2	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G6	3	Desconhecido 2	U2	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	H4	1	Desconhecido 2	U2	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H5	2	Desconhecido 2	U2	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H6	3	Desconhecido 2	U2	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	A7	1	Desconhecido 3	U3	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A8	2	Desconhecido 3	U3	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10

▼**M8**

Placa	Posição	Replicado	Tipo de poço	Código do poço	Código de concentração	Concentração inicial do concorrente (M)	Solução de reserva de hrER (µl)	Volume do tampão (µl)	Volume (µl) do traçador (E2 quente)	Volume a partir da placa de diluição (µl)	Volume final (µl)	Concentração final do concorrente (M)
P1	A9	3	Desconhecido 3	U3	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	B7	1	Desconhecido 3	U3	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B8	2	Desconhecido 3	U3	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B9	3	Desconhecido 3	U3	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C7	1	Desconhecido 3	U3	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C8	2	Desconhecido 3	U3	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C9	3	Desconhecido 3	U3	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	D7	1	Desconhecido 3	U3	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D8	2	Desconhecido 3	U3	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D9	3	Desconhecido 3	U3	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E7	1	Desconhecido 3	U3	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E8	2	Desconhecido 3	U3	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E9	3	Desconhecido 3	U3	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F7	1	Desconhecido 3	U3	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F8	2	Desconhecido 3	U3	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F9	3	Desconhecido 3	U3	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G7	1	Desconhecido 3	U3	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G8	2	Desconhecido 3	U3	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G9	3	Desconhecido 3	U3	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	H7	1	Desconhecido 3	U3	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H8	2	Desconhecido 3	U3	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H9	3	Desconhecido 3	U3	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	A10	1	Controlo E2 (máx.)	S	$E2_{máx}1$	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,00E-07
P1	A11	2	Controlo E2 (máx.)	S	$E2_{máx}2$	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,00E-07
P1	A12	3	Controlo E2 (máx.)	S	$E2_{máx}3$	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,00E-07
P1	B10	1	Controlo E2 (IC50)	S	$E2IC_{50}1$	$E2IC_{50}$ × 10	30	50	10	10	100	$E2IC_{50}$

▼M8

Placa	Posição	Replicado	Tipo de poço	Código do poço	Código de concentração	Concentração inicial do concorrente (M)	Solução de reserva de hrER (µl)	Volume do tampão (µl)	Volume (µl) do traçador (E2 quente)	Volume a partir da placa de diluição (µl)	Volume final (µl)	Concentração final do concorrente (M)
P1	B11	2	Controlo E2 (IC50)	S	$E2IC_{50}2$	$E2IC_{50}$ × 10	30	50	10	10	100	$E2IC_{50}$
P1	B12	3	Controlo E2 (IC50)	S	$E2IC_{50}3$	$E2IC_{50}$ × 10	30	50	10	10	100	$E2IC_{50}$
P1	C10	1	Controlo NE (máx.)	S	$Ne_{máx}1$	1,00E-3,5	30	50	10	10	100	1,00E-4,5
P1	C11	2	Controlo NE (máx.)	S	$Ne_{máx}2$	1,00E-3,5	30	50	10	10	100	1,00E-4,5
P1	C12	3	Controlo NE (máx.)	S	$Ne_{máx}3$	1,00E-3,5	30	50	10	10	100	1,00E-4,5
P1	D10	1	Controlo NE (IC50)	S	$NEIC_{50}1$	$NEIC_{50}$ × 10	30	50	10	10	100	$NEIC_{50}$
P1	D11	2	Controlo NE (IC50)	S	$NEIC_{50}2$	$NEIC_{50}$ × 10	30	50	10	10	100	$NEIC_{50}$
P1	D12	3	Controlo NE (IC50)	S	$NEIC_{50}3$	$NEIC_{50}$ × 10	30	50	10	10	100	$NEIC_{50}$
P1	E10	1	E2 frio (elevado)	NSB	S1	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E11	2	E2 frio (elevado)	NSB	S2	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E12	3	E2 frio (elevado)	NSB	S3	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F10	4	E2 frio (elevado)	NSB	S4	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F11	5	E2 frio (elevado)	NSB	S5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F12	6	E2 frio (elevado)	NSB	S6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	G10	1	Ligação total	TB	TB1	—	30	60	10	—	100	—
P1	G11	2	Ligação total	TB	TB2	—	30	60	10	—	100	—
P1	G12	3	Ligação total	TB	TB3	—	30	60	10	—	100	—

▼**M8**

Placa	Posição	Replicado	Tipo de poço	Código do poço	Código de concentração	Concentração inicial do concorrente (M)	Solução de reserva de hrER (µl)	Volume do tampão (µl)	Volume (µl) do traçador (E2 quente)	Volume a partir da placa de diluição (µl)	Volume final (µl)	Concentração final do concorrente (M)
P1	H10	4	Ligação total	TB	TB4	—	30	60	10	—	100	—
P1	H11	5	Ligação total	TB	TB5	—	30	60	10	—	100	—
P1	H12	6	Ligação total	TB	TB6	—	30	60	10	—	100	—

(*) Note-se que os poços «quentes» estão vazios durante a incubação. Os 10 µl são adicionados apenas para contagem de cintilação.

▼**M8**

Apêndice 4

CONSIDERAÇÕES PARA A ANÁLISE DE DADOS DO ENSAIO DE LIGAÇÃO COMPETITIVA HRER

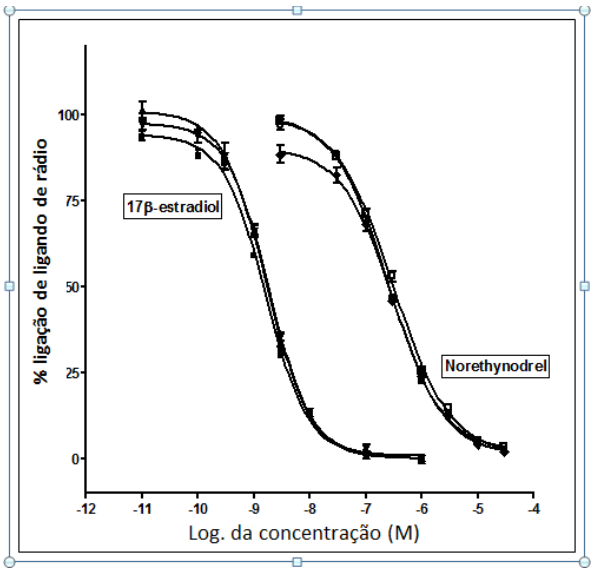
1. O ensaio de ligação competitiva hrERα mede a ligação de uma única concentração de [^{3}H]17β-estradiol na presença de concentrações crescentes de um produto químico em estudo. A curva de ligação competitiva é representada como a ligação específica do [^{3}H]17β-estradiol *versus* a concentração [$\log_{10}$ (unidades)] do concorrente. A concentração do produto químico em estudo que inibe 50 % da ligação máxima específica do [^{3}H]17β-estradiol é IC_{50}.

Análise de dados para estrogénios de referência e ligante fraco (1)

2. Os dados do controlo (isto é, a percentagem de ligação específica do [^{3}H]17β-estradiol e o logaritmo da concentração do produto químico de controlo) são transformados para análise. As estimativas de $\log(IC_{50})$ para os controlos positivos (por exemplo, estrogénios de referência e ligantes fracos) devem ser determinadas com recurso a um *software* de ajustamento não linear de ajustamento adequado, a fim de se adaptar à equação de quatro parâmetros de Hill (p. ex., BioSoft, GraphPad Prism). Em geral, o topo, a base, a curva e o $\log(IC_{50})$ devem ser mantidos inalterados quando se ajustam as curvas. Quando se determinar a melhor adequação, deve utilizar-se uma regressão sólida, a menos que seja apresentada uma justificação. Deve ser indicado método escolhido para uma regressão sólida. Não foi necessária correção da depleção do ligando para os ensaios de FW ou hrER do CERI, mas tal pode ser considerado, se necessário. Após a análise inicial, cada curva de ligação deve ser avaliada de modo a assegurar a adequação ao modelo. A afinidade de ligação relativa (RBA) do ligando fraco pode ser calculada como percentagem do $\log(IC_{50})$ para o ligante fraco em relação ao $\log(IC_{50})$ para o 17β-estradiol. Os resultados dos controlos positivos e do controlo do não ligante devem ser avaliados utilizando medidas de desempenho do ensaio e critérios de aceitabilidade conforme descritos no presente método de ensaio (ponto 20), no apêndice 2 (ensaio FW, pontos 41-51) e no apêndice 3 (ensaio CERI, pontos 41 a 51). A figura 1 apresenta exemplos de 3 séries de ensaios para os estrogénios de referência e os ligantes fracos.

Figura 1

Exemplos de curvas de ligação competitiva para os estrogénios de referência e para o controlo do ligante fraco



▼M8

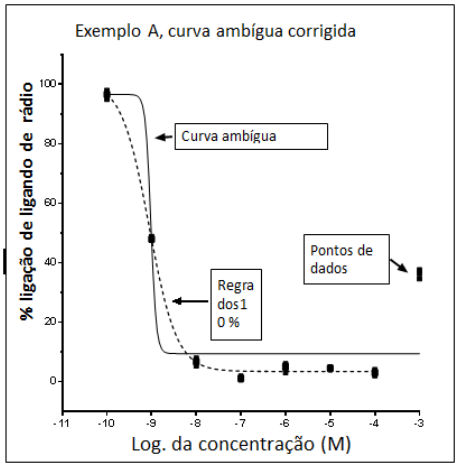
Análise de dados relativos aos produtos químicos em estudo

3. Os dados relativos a todos os produtos químicos em estudo devem ser analisados através de uma abordagem por etapas, para garantir que os dados são devidamente analisados e que cada ligação competitiva é devidamente classificada. Cada série de ensaios para um produto químico em estudo é inicialmente submetida a uma análise de dados normalizada idêntica à utilizada para os estrogénios de referência e para os controlos de ligantes fracos (ponto 55). Uma vez concluída, deve ser efetuada uma avaliação técnica dos parâmetros de ajustamento da curva, bem como uma análise visual do grau de adequação dos dados à curva de ligação competitiva gerada para cada série de ensaios. Durante esta avaliação técnica, as observações de uma diminuição dependente da concentração do [^{3}H]17β-estradiol especificamente ligado, da baixa variabilidade entre os replicados técnicos em cada concentração do produto químico em estudo e da coerência dos parâmetros de ajustamento entre as três séries de ensaios constituem uma boa indicação de que a análise de ensaios e de dados foi realizada de forma adequada. Aquando da análise dos resultados de cada produto químico em estudo, devem ser utilizados critérios profissionais e os dados utilizados para classificar cada produto químico em estudo como ligante ou não ligante devem ser cientificamente justificados.

4. Ocasionalmente, podem existir exemplos de dados que exijam uma atenção adicional na análise e interpretação adequada dos dados relativos à ligação do hrER. Estudos anteriores revelaram casos em que a análise e a interpretação de dados relativos à ligação competitiva ao recetor podem ser complicadas por uma mudança da percentagem específica de ligação no ensaio de produtos químicos com as concentrações mais elevadas (figura 2). Este é um problema bem conhecido, que ocorre quando se utilizam protocolos para uma série de ensaios de ligação competitiva ao recetor (3). Nestes casos, a resposta é dependente da concentração observada em concentrações mais baixas, mas, como a concentração do produto químico em estudo se aproxima do limite de solubilidade, o deslocamento do [^{3}H]17β-estradiol não diminui. Nestes casos, os dados relativos às concentrações mais elevadas indicam que o limite biológico do ensaio foi atingido. Por exemplo, este fenómeno está muitas vezes associado à insolubilidade e à precipitação dos produtos químicos em concentrações elevadas, embora também possa ser um reflexo da capacidade excessiva do carvão revestido de dextrano para capturar o ligando com marcação radioativa livre durante o procedimento de separação em concentrações químicas mais elevadas. Manter os pontos de dados em que os dados sobre o ajustamento da ligação competitiva a uma curva sigmoide pode, por vezes, conduzir a uma classificação incorreta do potencial de ligação do ER a um produto químico em estudo (figura 2). Para evitar tal facto, o protocolo relativo aos ensaios de ligação de FW e de hrER do CERI prevê a opção de excluir da análise pontos de dados em que a média dos replicados para a percentagem de ligação específica do [^{3}H]17β-estradiol seja superior em 10 % ou mais à média observada a uma concentração inferior (conhecida por «regra dos 10 %»). Esta regra apenas pode ser utilizada uma vez para uma curva determinada e deve haver dados remanescentes relativos a, pelo menos, 6 concentrações, de modo a que a curva possa ser corretamente classificada.

Figura 2

Exemplos de curvas de ligação competitiva com e sem recurso à regra dos 10 %

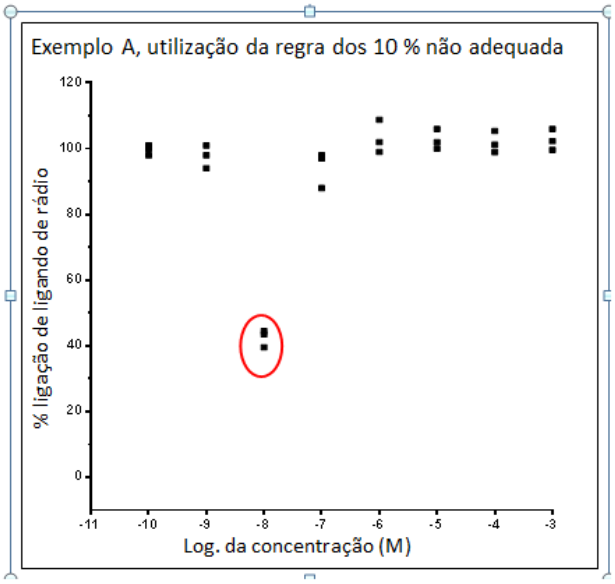


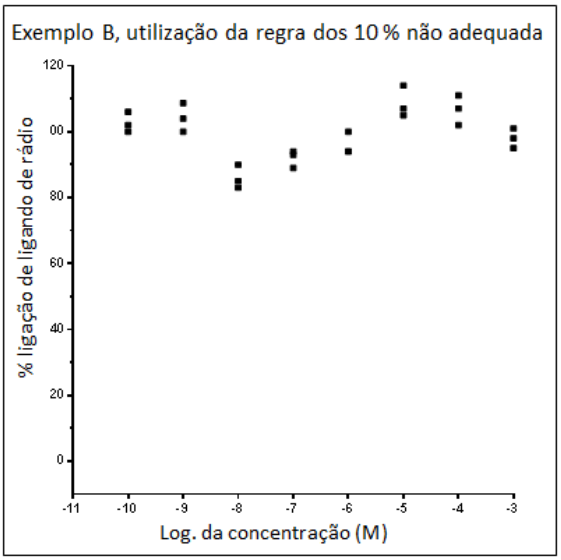
▼**M8**

5. A utilização adequada da regra dos 10 % para corrigir estas curvas deve ser cuidadosamente considerada e reservada para os casos em que exista uma forte indicação de uma ligante hrER. Durante a realização de experiências para o estudo de validação do ensaio de ligação hrER de FW, observou-se que a regra dos 10 % tinha por vezes uma consequência imprevista e inesperada. Os produtos químicos que não interagiam com o recetor (ou seja, os verdadeiros não ligantes) apresentavam frequentemente uma variabilidade de cerca de 100 % para a ligação radioativa que era superior a 10 % da gama de concentrações ensaiadas. Se o valor mais baixo correspondesse a uma concentração baixa, os dados de todas as concentrações mais elevadas poderiam potencialmente ser eliminados da análise, através da regra dos 10 %, mesmo que essas concentrações pudessem ser úteis para determinar se o produto químico era não ligante. A figura 3 mostra exemplos de situações em que a utilização da regra dos 10 % não é adequada.

Figura3

Exemplos, dados sobre a ligação competitiva em que não é adequada a aplicação da regra dos 10 %





▼**M8**

Referências bibliográficas

(1) OCDE (2015). *Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Recetor Alpha (hrERα)*, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 226), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(2) Motulsky H. and Christopoulos A. (2003). *The law of mass action, In Fitting Models to Biological Data Using Linear and Non-linear Regression*. GraphPad Software Inc., San Diego, CA, pp 187-191. Www.graphpad.com/manuals/Prism4/RegressionBook.pdf

(3) Laws SC, Yavanhxay S, Cooper RL, Eldridge JC. (2006). *Nature of the Binding Interaction for 50 Structurally Diverse Chemicals with Rat Estrogen Recetors*. Toxicological Sci. 94(1):46-56.

▼M8

B.71. ENSAIOS DE SENSIBILIZAÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO* RESPEITANTES A EVENTOS ESSENCIAIS DE ATIVAÇÃO DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS NA VIA DETERMINANTE DOS EFEITOS NOCIVOS PARA A SENSIBILIZAÇÃO CUTÂNEA

INTRODUÇÃO GERAL

Método de ensaio baseado no evento essencial relativo à ativação das células dendríticas

1. Um sensibilizante cutâneo é uma substância que provoca uma reação alérgica após contacto com a pele, conforme definido pelo Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos das Nações Unidas (GHS da ONU) (1) e o Regulamento (UE) n.º 1272/2008 relativo à classificação, rotulagem e embalagem de substâncias e misturas (CLP) ([1]). Existe consenso quanto aos principais eventos biológicos subjacentes à sensibilização cutânea. Os conhecimentos atuais sobre os mecanismos químicos e biológicos associados à sensibilização cutânea foram sintetizados na forma de uma via determinante dos efeitos nocivos (AOP – *Adverse Outcome Pathway*) no âmbito do programa AOP da OCDE (2), desde o evento molecular iniciador, passando pelos eventos intermédios, até ao efeito nocivo, designadamente a dermatite alérgica de contacto. Neste caso, o evento molecular iniciador (isto é, o primeiro evento essencial) é a ligação covalente das substâncias eletrófilas aos centros nucleófilos das proteínas da pele. O segundo evento essencial nesta AOP tem lugar nos queratinócitos e inclui respostas inflamatórias, bem como variações na expressão de genes associadas a vias de sinalização celular específicas, como as vias dependentes do elemento de resposta antioxidante/eletrófilo (ARE – *Antioxidant Response Element*). O terceiro evento essencial é a ativação das células dendríticas, normalmente avaliada com base na expressão de marcadores específicos da superfície celular (quimocinas e citocinas). O quarto evento essencial consiste na ativação e na proliferação de células T, que é avaliada indiretamente no ensaio de gânglios linfáticos locais com murídeos (LLNA – *Local Lymph Node Assay*) (3).

2. O presente método de ensaio é equivalente à orientação de ensaio (TG — *Test Guideline*) 442E (2017) da OCDE. Descreve os ensaios *in vitro* respeitantes aos mecanismos descritos no evento essencial relativo à ativação das células dendríticas na AOP para a sensibilização cutânea (2). O método de ensaio inclui ensaios para apoiar a discriminação entre sensibilizantes e não sensibilizantes cutâneos, em conformidade com o GHS da ONU e com o CLP.

   Os ensaios descritos no presente método de ensaio são os seguintes:

   — Teste de ativação da linha celular humana (h-CLAT)

   — Teste de ativação da linha celular U937 (U-SENS™)

   — Ensaio por gene repórter da interleucina-8 (ensaio IL-8 Luc)

3. Os ensaios incluídos no presente método e as orientações de ensaio da OCDE correspondentes podem diferir em relação ao procedimento utilizado para gerar os dados e efetuar as medições, mas podem ser utilizados indiscriminadamente para satisfazer as exigências dos países quanto aos resultados dos ensaios sobre o evento essencial de ativação das células dendríticas na AOP para a sensibilização cutânea, beneficiando simultaneamente da aceitação mútua de dados da OCDE.

([1]) Regulamento (CE) n.º 1272/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16 de dezembro de 2008, relativo à classificação, rotulagem e embalagem de substâncias e misturas, que altera e revoga as Diretivas 67/548/CEE e 1999/45/CE, e altera o Regulamento (CE) n.º 1907/2006 (JO L 353/1 de 31.12.2008, p. 1).

▼M8

Antecedentes e princípios dos ensaios incluídos no método de ensaio baseado nos eventos essenciais

4. Tradicionalmente, a determinação da sensibilização cutânea implica o recurso a animais de laboratório. Os métodos clássicos que utilizam porquinhos-da-índia — ensaio de maximização com porquinhos-da-índia (GMPT) de Magnusson e Kligman e ensaio de Buehler (TM B.6) (4) — avaliam as fases de indução e de desencadeamento da sensibilização cutânea. Vulgarizaram-se também os ensaios com murídeos, o LLNA (TM B.42) (3) e duas alterações deste sem recurso a isótopos radioativos — LLNA: DA (TM B.50) (5) e LLNA: BrdU-ELISA (TM B.51) (6) —, que determinam exclusivamente a resposta indutiva, uma vez que apresentam vantagem em relação aos ensaios com porquinhos-da-índia no tocante ao bem-estar animal e proporcionam uma medição objetiva da fase de indução da sensibilização cutânea.

5. Mais recentemente, foram adotados métodos de ensaio de tipo mecanístico *in chemico* e *in vitro* respeitantes ao primeiro evento essencial (TM B.59; ensaio de reatividade direta de péptidos (7)) e ao segundo evento essencial [TM B.60; método ARE-Nrf2 luciferase (8)] da AOP de sensibilização cutânea, a fim de contribuir para a avaliação do potencial de perigo de sensibilização cutânea dos produtos químicos.

6. Os ensaios descritos no presente método de ensaio permitem quantificar quer as variações na expressão do(s) marcador(es) da superfície celular associada(s) ao processo de ativação dos monócitos e das células dendríticas após a exposição a um sensibilizante (por exemplo, CD54, CD86), quer as variações na expressão da IL-8, uma citocina associada à ativação das células dendríticas. Existem referências de que os sensibilizantes cutâneos induzem a expressão de marcadores da membrana celular, nomeadamente CD40, CD54, CD80, CD83 e CD86, para além de induzirem citocinas pró-inflamatórias, tais como a IL-1β e a TNF-α, e várias quimocinas, entre as quais a IL-8 (CXCL8) e a CCL3 (9) (10) (11) (12), associados à ativação das células dendríticas (2).

7. No entanto, como a ativação das células dendríticas representa apenas um evento essencial da AOP de sensibilização cutânea (2) (13), as informações geradas pelos ensaios que medem unicamente os marcadores da ativação das células dendríticas podem não bastar para concluir a existência ou ausência de potencial de sensibilização cutânea dos produtos químicos. Por conseguinte, propõem-se os dados gerados com os ensaios descritos no presente método de ensaio para ajudar a distinguir os sensibilizantes (ou seja, categoria 1 do GHS da ONU/CLP) dos não sensibilizantes cutâneos utilizados no âmbito das abordagens integradas de ensaio e avaliação (IATA — *Integrated Approaches to Testing and Assessment*), juntamente com outras informações complementares decorrentes, por exemplo, de ensaios *in vitro* respeitantes a outros eventos essenciais da AOP de sensibilização cutânea, bem como métodos sem ensaios, nomeadamente a interpolação com base em dados relativos a produtos químicos análogos (13). Encontram-se na literatura exemplos de utilização dos dados obtidos com estes ensaios no âmbito de abordagens definidas – ou seja, abordagens normalizadas no que diz respeito ao conjunto de fontes de informação utilizadas e aos procedimentos de análise dos dados para efeitos de previsão (13) –, que podem ser elementos úteis no âmbito das IATA.

8. Os ensaios descritos no presente método não podem ser utilizados isoladamente, nem para classificar os sensibilizantes cutâneos nas subcategorias 1A e 1B do GHS da ONU/CLP pelas autoridades responsáveis pela aplicação destas duas subcategorias facultativas, nem para prever o potencial de sensibilização no contexto de avaliações de segurança. Todavia, consoante o quadro regulamentar, os resultados positivos obtidos com estes métodos podem ser utilizados isoladamente para classificar um produto químico na categoria 1 do GHS da ONU/CLP.

▼M8

9. No presente método de ensaio, o termo «produto químico em estudo» designa o produto que é objeto do ensaio ([1]) e não as substâncias monocomponentes, substâncias multicomponentes e/ou misturas às quais os métodos sejam aplicáveis. Atualmente, dispõe-se de informações limitadas sobre a aplicabilidade dos ensaios a substâncias multicomponentes/misturas (14) (15). Os ensaios são, porém, tecnicamente aplicáveis ao ensaio de substâncias multicomponentes e misturas. Contudo, antes da aplicação do presente método de ensaio a uma mistura para se obterem dados para efeitos regulamentares, importa ponderar se — e, em caso afirmativo, por que motivo — o método pode proporcionar resultados adequados para o efeito ([2]). Tais considerações não são necessárias se houver um requisito regulamentar para o ensaio da mistura. Acresce que, no caso de ensaios de substâncias multicomponentes ou de misturas, deve ser tida em conta a possível interferência de componentes citotóxicos com as respostas observadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(1) United Nations UN (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Sixth revised edition. Nova Iorque e Genebra: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1--117006-1. Disponível em: https://www.unece.org/trans/danger/publi//ghs/ghs_rev06/06files_e.html.

(2) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No. 168. Disponível em: http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM//MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En.

(3) Capítulo B.42 do presente anexo: Ensaio de gânglios linfáticos locais.

(4) Capítulo B.6 do presente anexo: Sensibilização cutânea.

(5) Capítulo B.50 do presente anexo: Sensibilização cutânea: ensaio de gânglios linfáticos locais: DA.

(6) Capítulo B.51 do presente anexo: Sensibilização cutânea: ensaio de gânglios linfáticos locais: BrdU-ELISA.

(7) Capítulo B.59 do presente anexo: Sensibilização cutânea *in chemico*: ensaio de reatividade direta de péptidos (DPRA).

(8) Capítulo B.60 do presente anexo: Sensibilização cutânea *in vitro*: método ARE-Nrf2 luciferase.

(9) Steinhman RM. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. Annu Rev Immunol 9:271-96.

(10) Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Azuma M, Okumura K, Lanier LL, and Banchereau J. (1994). B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. J Exp Med 180:1841-7.

(11) Aiba S, Terunuma A, Manome H, and Tagami H. (1997). Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules. Eur J Immunol 27:3031-8.

([1]) Em junho de 2013, na Reunião Conjunta da OCDE, foi decidido que, sempre que possível, deverá ser aplicada uma utilização mais coerente do termo «produto químico em estudo», descrevendo o produto que é objeto do ensaio em orientações de ensaio novas e atualizadas da OCDE.

([2]) Esta frase foi proposta e aprovada na reunião do WNT de abril de 2014

▼**M8**

(12) Aiba S, Manome H, Nakagawa S, Mollah ZU, Mizuashi M, Ohtani T, Yoshino Y, and Tagami. H. (2003). p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases play distinct roles in the activation of dendritic cells by two representative haptens, NiCl2 and DNCB. J Invest Dermatol 120:390-8.

(13) OECD (2016). Series on Testing & Assessment No 256: Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Annex 1 and Annex 2. ENV/JM/HA(2016)29. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Disponível em: https://community.oecd.org/community/iatass.

(14) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, NishiyamaN, Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). Altern. Lab. Anim. 38, 275-284.

(15) Piroird, C., Ovigne, J.M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* 29, 901-916.

▼**M8**

Apêndice 1

SENSIBILIZAÇÃO CUTÂNEA IN VITRO: TESTE DE ATIVAÇÃO DA LINHA CELULAR HUMANA (H-CLAT)

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES

1. O método de ensaio h-CLAT permite quantificar as variações na expressão dos marcadores da superfície celular associadas ao processo de ativação dos monócitos e das células dendríticas (ou seja, CD86 e CD54), na linha celular da leucemia monocítica humana THP-1, após a exposição a sensibilizantes (1) (2). Os níveis de expressão medidos para os marcadores da superfície celular CD86 e CD54 são, em seguida, utilizados para ajudar a distinguir os sensibilizantes dos não sensibilizantes cutâneos.

2. O método de ensaio h-CLAT foi avaliado num estudo de validação coordenado pelo Laboratório de Referência da União Europeia para as Alternativas à Experimentação em Animais (EURL ECVAM), seguido de uma análise independente por pares do Comité Científico Consultivo do EURL ECVAM (ESAC). Tendo em conta todos os dados disponíveis e os contributos das entidades reguladoras e das partes interessadas, o método foi recomendado pelo EURL ECVAM (3) para utilização no âmbito de uma IATA, com o objetivo de ajudar a distinguir os sensibilizantes dos não sensibilizantes para efeitos de classificação e rotulagem de perigos. As referências bibliográficas contêm exemplos da utilização de dados h-CLAT combinados com outras informações (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11).

3. O método de ensaio h-CLAT demonstrou ser transferível para laboratórios com experiência em técnicas de cultura celular e análise por citometria de fluxo. O nível de reprodutibilidade esperado das previsões decorrentes do ensaio é da ordem dos 80 %, tanto intralaboratorial como interlaboratorial (3) (12). Os resultados do estudo de validação (13) e de outros estudos publicados (14) indicam, em termos gerais, que, comparativamente com os resultados obtidos pelo método LLNA, a precisão na distinção entre sensibilizantes cutâneos (cat. 1 do GHS da ONU/CLP) e não sensibilizantes é de 85 % (N=142), com uma sensibilidade de 93 % (94/101) e uma especificidade de 66 % (27/41), a partir de uma nova análise do EURL ECVAM (12), tendo em conta todos os dados existentes, mas excluindo os resultados negativos obtidos para produtos químicos com coeficiente de partição octanol-água (log P) superior a 3,5, conforme descrito no ponto 4. É mais provável que os falsos resultados negativos nas previsões efetuadas com o método h-CLAT digam respeito a produtos químicos com potencial de sensibilização cutânea baixo a moderado (subcategoria 1B do GHS da ONU/CLP) do que a produtos químicos com um potencial de sensibilização cutânea elevado (subcategoria 1A do GHS da ONU/CLP) (4) (13) (15). No seu conjunto, estas informações demonstram a utilidade do método h-CLAT para a identificação dos perigos de sensibilização cutânea. No entanto, os valores relativos à precisão do método de ensaio h-CLAT utilizado isoladamente são meramente indicativos, uma vez que o presente método deve ser combinado com outras fontes de informação no contexto de uma IATA e em conformidade com o disposto nos pontos 7 e 8 da Introdução Geral. Além disso, na avaliação de métodos de estudo da sensibilização cutânea que não utilizem animais, deve ter-se em mente que o método LLNA, tal como outros ensaios que utilizam animais, pode não refletir de forma adequada a situação no ser humano.

4. Os dados atualmente disponíveis demonstram que o método h-CLAT é aplicável a produtos químicos em estudo que abrangem uma grande diversidade de grupos funcionais orgânicos, mecanismos de reação, potências de sensibilização cutânea (determinadas em estudos *in vivo*) e propriedades físico-químicas (3) (14) (15). O método é aplicável a produtos químicos solúveis ou que formem uma dispersão estável – ou seja, um coloide ou uma suspensão em que o produto em estudo não se deposite nem se separe do solvente/veículo formando diferentes fases – num solvente/veículo adequado (ver ponto 14). Os produtos químicos com log P superior a 3,5 tendem a produzir resultados negativos falsos (14). Por conseguinte, os

▼M8

resultados negativos obtidos com produtos químicos em estudo que apresentem um log P superior a 3,5 não devem ser tidos em conta. No entanto, os resultados positivos obtidos com produtos químicos em estudo que apresentem um log P superior a 3,5 poderão ser utilizados para ajudar a identificar o produto químico em estudo como sensibilizante cutâneo. Além disso, devido à limitada capacidade metabólica da linha celular utilizada (16) e às condições experimentais, os pró-haptenos (substâncias que requerem ativação enzimática, por exemplo através das enzimas P450) e os pré-haptenos (substâncias ativadas por oxidação), em particular os que apresentem uma taxa de oxidação lenta, podem também produzir resultados negativos no h-CLAT (15). É possível avaliar produtos químicos fluorescentes com o h-CLAT (17). No entanto, os produtos fortemente fluorescentes que emitem no mesmo comprimento de onda que o isotiocianato de fluoresceína (FITC) ou que o iodeto de propídio (IP) interferem com a deteção por citometria de fluxo, pelo que não podem ser corretamente avaliados utilizando anticorpos conjugados com FITC ou IP. Neste caso, é possível recorrer, respetivamente, a outros anticorpos marcados com fluorocromos ou a outros marcadores de citotoxicidade, desde que seja possível demonstrar que produzem resultados semelhantes aos dos anticorpos marcados com FITC (ver ponto 24) ou com IP (ver ponto 18), por exemplo testando as substâncias para demonstração de competência indicadas nos apêndices 1-2. À luz do que precede, os resultados negativos devem ser interpretados no contexto das limitações indicadas e em conjunto com outras fontes de informação no âmbito da IATA. Nos casos em que se demonstre que o método h-CLAT não é aplicável a outras categorias específicas de produtos químicos em estudo, o mesmo não deve ser utilizado para essas categorias específicas.

5. Tal como descrito acima, o método h-CLAT ajuda a distinguir os sensibilizantes cutâneos dos não sensibilizantes. Porém, quando utilizado no âmbito de abordagens integradas do tipo IATA, pode também contribuir para a avaliação do potencial de sensibilização (4) (5) (9). Contudo, é necessário continuar a trabalhar, de preferência com base em dados humanos, para determinar o modo como os resultados do h-CLAT poderão vir a ser úteis para este tipo de avaliação.

6. São apresentadas definições no apêndice 1.1.

PRINCÍPIO DO ENSAIO

7. O método h-CLAT é um ensaio *in vitro* que permite quantificar as variações da expressão de marcadores (CD86 e CD54) da superfície das células da linha celular da leucemia monocítica humana THP-1, após uma exposição de 24 horas ao produto químico em estudo. Estas moléculas de superfície são marcadores típicos da ativação dos monócitos THP-1 e podem imitar a ativação das células dendríticas, o que desempenha um papel crítico na ativação das células T. As variações na expressão dos marcadores de superfície são medidas por citometria de fluxo após coloração das células com anticorpos marcados com fluorocromo. A citotoxicidade é medida em paralelo, a fim de determinar se a ativação da expressão dos marcadores de superfície ocorre a concentrações subcitotóxicas. A intensidade relativa de fluorescência dos marcadores de superfície, em comparação com a do controlo do solvente/veículo, é calculada e utilizada no modelo preditivo (ver ponto 26), para ajudar a distinguir os sensibilizantes dos não sensibilizantes.

DEMONSTRAÇÃO DE COMPETÊNCIA

8. Antes de utilizarem, por rotina, o ensaio descrito no presente apêndice do método de ensaio B.71, os laboratórios devem demonstrar a sua competência utilizando as dez substâncias enumeradas no apêndice 1.2. Além disso, os utilizadores do ensaio devem manter uma base de dados históricos resultantes dos controlos de reatividade (ver ponto 11) e obtidos com o controlo positivo e com o controlo do solvente/veículo (ver pontos 20 a 22) e devem utilizar esses dados para confirmar que a reprodutibilidade do método de ensaio no seu laboratório se mantém ao longo do tempo.

▼M8

PROCEDIMENTO

9. O presente método de ensaio baseia-se no protocolo n.º 158 do serviço de base de dados sobre os métodos alternativos à experimentação em animais (DB-ALM — DataBase service on ALternative Methods to animal experimentation) h-CLAT (18), que é o protocolo utilizado para o estudo de validação coordenado pelo EURL ECVAM. Recomenda-se a utilização deste protocolo aquando da implementação e utilização, no laboratório, do método h-CLAT. Segue-se uma descrição dos principais elementos e procedimentos do método h-CLAT, que compreende duas etapas: um *ensaio de determinação da dose* e uma *medição da expressão de CD86/CD54*.

Preparação das células

10. Para a execução do método h-CLAT, deve utilizar-se a linha celular da leucemia monocítica humana, THP-1. Recomenda-se que as células (TIB-202™) sejam obtidas junto de um banco de células reconhecido, como a American Type Culture Collection.

11. As células THP-1 são cultivadas a 37°C numa atmosfera humidificada a 5 % CO_2, em meio RPMI-1640 complementado com 10 % de soro bovino fetal (SBF), 0,05 mM de 2-mercaptoetanol, 100 unidades/ml de penicilina e 100 μg/ml de estreptomicina. A utilização da penicilina e da estreptomicina no meio de cultura pode ser evitada. No entanto, nesse caso, os utilizadores devem verificar se a ausência de antibióticos no meio de cultura não tem qualquer impacto nos resultados, por exemplo testando as substâncias enumeradas no apêndice 1.2. De qualquer modo, para minimizar o risco de contaminação, devem seguir-se as boas práticas de cultura celular independentemente da presença ou não de antibióticos no meio de cultura celular. As células THP-1 são inoculadas regularmente a cada 2-3 dias, a uma densidade compreendida entre 0,1 e 0,2 × 10^6 células/ml, e devem ser mantidas a uma densidade compreendida entre 0,1 e 1,0 × 10^6 células/ml. Antes da sua utilização para o ensaio, as células devem ser qualificadas através de um controlo de reatividade. Este controlo deve ser realizado duas semanas após a descongelação, utilizando como controlos positivos o 2,4-dinitroclorobenzeno (DNCB) (n.º CAS 97-00-7, pureza ≥ 99 %) e o sulfato de níquel ($NiSO_4$) (n.º CAS 10101-97-0, pureza ≥ 99 %) e como controlo negativo o ácido láctico (AL) (n.º CAS 50-21-5, pureza ≥ 85 %). Tanto o DNCB como o $NiSO_4$ devem dar respostas positivas para os marcadores de superfície celular CD86 e CD54; o ácido láctico deve dar uma resposta negativa para os marcadores de superfície celular CD86 e CD54. Apenas serão utilizadas para o ensaio as células que tenham passado o controlo de reatividade. As células podem ser propagadas até dois meses após a descongelação, sem ultrapassar as 30 passagens. O controlo de reatividade deve ser efetuado de acordo com os procedimentos descritos nos pontos 20 a 24.

12. Para o ensaio, as células THP-1 são inoculadas a uma densidade de 0,1 × 10^6 células/ml ou 0,2 × 10^6 células/ml e pré-cultivadas em frascos de cultura durante 72 horas ou 48 horas, respetivamente. É importante que a densidade celular no frasco de cultura imediatamente após o período de pré-cultura seja o mais coerente possível em cada experiência (utilizando uma das duas condições de pré-cultura acima descritas), uma vez que a densidade celular no frasco de cultura imediatamente após a pré-cultura pode influenciar a expressão de CD86/CD54 induzida por alergénios (19). No dia do ensaio, as células colhidas do frasco de cultura são novamente colocadas em suspensão num meio de cultura fresco a uma densidade de 2 × 10^6 células/ml. Em seguida, distribuem-se as células numa placa de 24 poços de fundo plano (500 μl, 1 × 10^6 células/poço) ou numa placa de 96 poços de fundo plano (80 μl, 1,6 × 10^5 células/poço).

Ensaio de determinação da dose

13. Efetua-se um *ensaio de determinação da dose* para apurar o valor CV75, ou seja, a concentração do produto químico em estudo que resulta numa viabilidade celular (CV) de 75 %, em comparação com o controlo do solvente/veículo. O valor CV75 é utilizado para determinar a concentração de produtos químicos em estudo a utilizar para a medição da expressão de *CD86/CD54* (ver pontos 20 a 24).

▼**M8**

Preparação dos produtos químicos em estudo e das substâncias de controlo

14. Os produtos químicos em estudo e as substâncias de controlo são preparados no dia do ensaio. No caso do método h-CLAT, os produtos químicos em estudo são dissolvidos ou dispersos de forma estável (ver também o ponto 4) escolhendo de preferência como solvente/veículo uma solução salina ou o meio ou, como segunda opção, dimetilsulfóxido (DMSO, pureza ≥ 99 %), se o produto químico não for solúvel ou não formar uma dispersão estável nos dois solventes/veículos anteriores, até concentrações finais de 100 mg/ml (solução salina ou meio) ou de 500 mg/ml (DMSO). É possível utilizar solventes/veículos diferentes dos acima descritos, desde que a escolha seja suficientemente fundamentada do ponto de vista científico. Deve ter-se em conta a estabilidade do produto químico em estudo no solvente/veículo final.

15. A partir das soluções-mãe dos produtos químicos em estudo a 100 mg/ml (em solução salina ou meio) ou a 500 mg/ml (em DMSO), devem efetuar-se as diluições seguintes:

— Se o solvente/veículo for a solução salina ou o meio: preparam-se oito soluções-mãe (oito concentrações) através de uma série de diluições de fator 2 utilizando o solvente/veículo correspondente. Estas soluções-mãe são depois novamente diluídas por um fator de 50 no meio de cultura (soluções de trabalho). Se a concentração final máxima de 1 000 μg/ml na placa não for tóxica, a concentração máxima deve ser novamente determinada através da realização de um novo ensaio de citotoxicidade. A concentração final na placa não deve exceder 5 000 μg/ml para os produtos químicos em estudo dissolvidos ou em dispersão estável na solução salina ou no meio.

— Se o solvente/veículo for o DMSO: preparam-se oito soluções-mãe (oito concentrações) através de uma série de diluições de fator 2 utilizando o solvente/veículo correspondente. Estas soluções-mãe são depois novamente diluídas por um fator de 250 no meio de cultura (soluções de trabalho). A concentração final na placa, mesmo que não seja tóxica, não deve exceder 1 000 μg/ml.

Para a exposição, utilizam-se, por fim, as soluções de trabalho, adicionando o mesmo volume de cada uma destas ao volume de células THP-1 em suspensão na placa (ver também o ponto 17), a fim de obter uma diluição suplementar de fator 2 (em geral, as concentrações finais na placa encontram-se no intervalo entre 7,81-1 000 μg/ml).

16. O controlo do solvente/veículo utilizado no método h-CLAT é o meio de cultura (para os produtos químicos em estudo dissolvidos ou em dispersão estável (ver ponto 4) no meio ou na solução salina) ou o DMSO (para os produtos químicos em estudo dissolvidos ou em dispersão estável no DMSO) a uma concentração final única de 0,2 % na placa. Efetua-se uma diluição idêntica à descrita para as soluções de trabalho no ponto 15.

Aplicação dos produtos químicos em estudo e das substâncias de controlo

17. O meio de cultura ou as soluções de trabalho, que se descrevem nos pontos 15 e 16, misturam-se na proporção 1:1 (v/v) com as suspensões celulares preparadas na placa de 24 poços ou de 96 poços de fundo plano (ver ponto 12). As placas tratadas são, em seguida, incubadas durante 24 ± 0,5 horas a 37°C, 5 % CO_2. Deve ter-se o cuidado de evitar a evaporação dos produtos químicos em estudo, caso sejam voláteis, e a contaminação cruzada entre poços pelos referidos produtos, por exemplo selando a placa antes da incubação com os produtos químicos em estudo (20).

▼**M8**

Coloração com iodeto de propídio (IP)

18. Após 24 ± 0,5 horas de exposição, as células são transferidas para tubos de ensaio e recolhidas por centrifugação. Rejeitam-se os sobrenadantes e as restantes células são novamente colocadas em suspensão em 200 µl (no caso da placa de 96 poços) ou 600 µl (no caso da placa de 24 poços) de um tampão fosfato salino contendo 0,1 % de albumina de soro bovino (tampão de coloração). Transferem-se 200 µl da suspensão de células para uma placa de 96 poços de fundo redondo (no caso da placa de 96 poços) ou para um microtubo (no caso da placa de 24 poços); em seguida, as células são lavadas duas vezes com 200 µl (no caso da placa de 96 poços) ou 600 µl (no caso da placa de 24 poços) de tampão de coloração. Por último, as células são novamente suspensas no tampão de coloração (por exemplo, 400 µl), sendo acrescentada uma solução de IP (por exemplo, 20 µl) (para obter, por exemplo, uma concentração final de IP de 0,625 µl/ml). Podem utilizar-se outros marcadores de citotoxicidade, tais como a 7-aminoactinomicina D (7-AAD), o azul de Trypan ou outros, desde que se possa demonstrar que produzem resultados semelhantes ao IP, por exemplo testando as substâncias enumeradas no apêndice 1.2.

Medição da citotoxicidade por citometria de fluxo e estimativa do valor CV75

19. O nível de fixação do IP é analisado por citometria de fluxo no canal FL-3. No total, são analisadas 10 000 células vivas (IP negativo). A viabilidade celular pode ser calculada pelo programa de análise do citómetro utilizando a equação indicada em baixo. Se a viabilidade celular for baixa, devem ser adquiridas, no máximo, 30 000 células, incluindo células mortas. Uma outra opção consiste em adquirir os dados durante um minuto após o início da análise.

$$Viabilidade\ celular = \frac{Número\ de\ células\ vivas}{Número\ total\ de\ células\ adquiridas} \times 100$$

O valor CV75 (ver ponto 13), isto é, a concentração que provoca 75 % de sobrevivência das células THP-1 (25 % de citotoxicidade), é calculado por interpolação linear logarítmica utilizando a seguinte equação:

$$Log\ CV75 = \frac{(75 - c) \times Log(b) - (75 - a) \times Log(d)}{a - c}$$

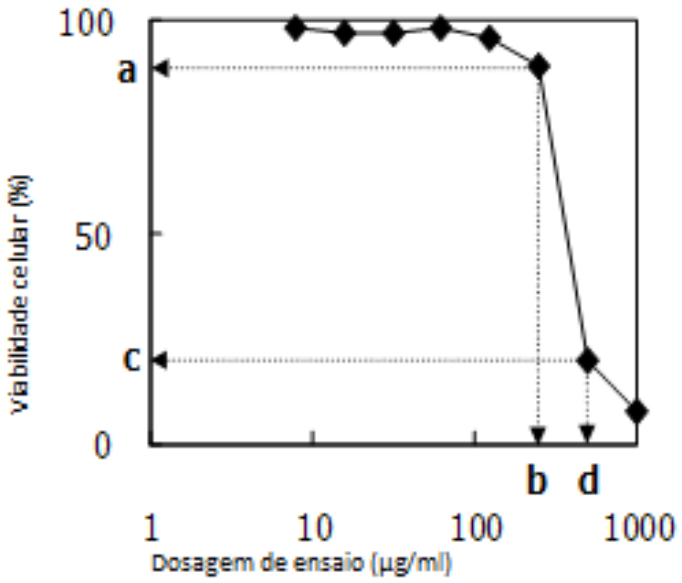
em que:

a é o valor mínimo de viabilidade celular superior a 75 %

c é o valor máximo de viabilidade celular inferior a 75 %

b e d são as concentrações que provocam os valores de viabilidade celular a e c, respetivamente

▼M8



Podem utilizar-se outras abordagens para calcular o CV75, desde que fique demonstrado que tal não tem qualquer impacto nos resultados (por exemplo, testando as substâncias para demonstração de competência).

Medição da expressão de CD86/CD54

Preparação dos produtos químicos em estudo e das substâncias de controlo

20. Utiliza-se o solvente/veículo adequado (solução salina, meio ou DMSO; ver o ponto 14) para dissolver os produtos químicos em estudo ou para criar uma dispersão estável. Os produtos químicos em estudo são primeiro diluídos até uma concentração correspondente a 100 vezes (na solução salina ou no meio) ou 500 vezes (no DMSO) o valor CV75 × 1,2 determinado no *ensaio de determinação da dose* (ver ponto 19). Se o CV75 não puder ser determinado (ou seja, se a citotoxicidade observada no *ensaio de determinação da dose* for insuficiente), deve utilizar-se como concentração inicial a concentração solúvel ou em dispersão estável mais elevada do produto químico em estudo preparado com cada solvente/veículo. Note-se que a concentração final na placa não deve exceder 5 000 µg/ml (no caso da solução salina ou do meio) ou 1 000 µg/ml (no caso do DMSO). Seguidamente, são realizadas diluições em série de fator 1:2 utilizando o solvente/veículo correspondente para obter as soluções-mãe (oito concentrações entre 100 × 1,2 × CV75 e 100×0,335 × CV75 (na solução salina ou no meio) ou entre 500×1,2 × CV75 e 500×0,335 × CV75 (no DMSO)), que serão testadas de acordo com o método h-CLAT (ver o protocolo DB-ALM n.º 158 para um exemplo do esquema de dosagem). As soluções-mãe são depois novamente diluídas por um fator de 50 (solução salina ou meio) ou de 250 (DMSO) no meio de cultura (soluções de trabalho). Estas soluções de trabalho são finalmente utilizadas para exposição, após uma diluição final de fator 2 na placa. Se os resultados não satisfizerem os critérios de aceitação descritos nos pontos 29 e 30 quanto à viabilidade celular, pode repetir-se o ensaio de determinação da dose para deduzir um valor CV75 mais preciso. Note-se que apenas podem ser utilizadas placas de 24 poços para a medição da expressão de CD86/CD54.

21. O controlo do solvente/veículo é preparado conforme descrito no ponto 16. O controlo positivo utilizado no método h-CLAT é o DNCB (ver ponto 11), para o qual são preparadas soluções-mãe em DMSO e diluídas tal como descrito para as soluções-mãe no ponto 20. O DNCB deve ser utilizado como controlo positivo para a *medição da expressão de CD86/CD54* a uma concentração final única na placa (geralmente 4,0 µg/ml). Para obter

▼M8

uma concentração de 4,0 μg/ml de DNCB na placa, prepara-se uma solução-mãe de 2 mg/ml de DNCB em DMSO, que é depois novamente diluída por um fator de 250 no meio de cultura, até se obter uma solução de trabalho a 8 μg/ml. Em alternativa, pode utilizar-se o valor CV75 do DNCB, determinado em cada instalação de ensaio, como concentração do controlo positivo. Podem utilizar-se outros controlos positivos adequados se houver dados históricos que permitam definir critérios de aceitação comparáveis para a execução. Para os controlos positivos, a concentração final única na placa não deve exceder 5 000 μg/ml (no caso da solução salina ou meio) ou 1 000 μg/ml (no caso do DMSO). Os critérios de aceitação para a execução são idênticos aos descritos para o produto químico em estudo (ver ponto 29), exceto no que diz respeito ao último critério, uma vez que o controlo positivo é testado a uma concentração única.

Aplicação dos produtos químicos em estudo e das substâncias de controlo

22. Para obter uma previsão, é necessária uma experiência para cada produto químico em estudo e para cada substância de controlo. Cada experiência consiste em pelo menos duas execuções independentes para a *medição de expressão de CD86/CD54* (ver pontos 26 a 28). Cada execução independente é efetuada num dia diferente ou no mesmo dia, desde que, para cada execução: a) sejam preparadas soluções-mãe e de trabalho frescas, independentes, do produto químico em estudo e soluções de anticorpos, e b) sejam utilizadas células colhidas em dois tempos independentes (provenientes de frascos de cultura diferentes); no entanto, as células podem ser provenientes da mesma passagem. Os produtos químicos em estudo e as substâncias de controlo preparados como soluções de trabalho (500 μl) são misturados com 500 μl de suspensão de células ($1x10^6$ células) a um rácio de 1:1 e as células são incubadas durante 24 ± 0,5 horas, conforme descrito nos pontos 20 e 21. Em cada execução, basta um único replicado para cada concentração do produto química em estudo e da substância de controlo, dado que a previsão é obtida a partir de, pelo menos, duas execuções independentes.

Coloração celular e análise

23. Após 24 ± 0,5 horas de exposição, as células são transferidas da placa de 24 poços para tubos de ensaio e recolhidas por centrifugação, antes de serem lavadas duas vezes com 1 ml de tampão de coloração (se necessário, podem ser efetuadas etapas de lavagem suplementares). Após a lavagem, as células são bloqueadas com 600 μl de solução de bloqueio [tampão de coloração com 0,01 % (m/v) de globulina (fração Cohn II, III, humana; SIGMA, #G2388-10G ou equivalente)] e incubadas a 4°C durante 15 minutos. Após o bloqueio, as células são divididas em três alíquotas de 180 μl numa placa de 96 poços de fundo redondo ou num microtubo.

24. Após centrifugação, as células são coradas a 4°C durante 30 minutos com 50 μl de anticorpos marcados com FITC anti-CD86, anti-CD54 ou de ratinho (isótipo) IgG1. Os anticorpos descritos no protocolo DB-ALM n.° 158 h-CLAT (18) devem ser diluídos no tampão de coloração a um rácio de 3:25 v/v [para CD86 (BD-PharMingen, #555657; Clone: Fun-1) ou de 3:50 v/v (para CD54 (DAKO, #F7143; Clone: 6.5B5) e IgG1 (DAKO, #X0927)]. Estes rácios de diluição dos anticorpos foram definidos aquando do desenvolvimento do ensaio como aqueles que apresentam a melhor relação sinal/ruído. A experiência adquirida aquando do desenvolvimento do ensaio indica que a intensidade da fluorescência dos anticorpos é geralmente coerente entre diferentes lotes. No entanto, os utilizadores podem ponderar a possibilidade de proceder à titulação dos anticorpos em condições laboratoriais próprias, a fim de definir as concentrações mais adequadas. Podem ser utilizados anticorpos anti-CD86 e/ou anti-CD54 marcados por outros fluorocromos, desde que seja possível demonstrar que produzem resultados semelhantes aos anticorpos conjugados por FITC, por exemplo testando as substâncias enumeradas no apêndice 1.2. Note-se que a alteração do clone ou do fornecedor dos anticorpos, tal como descrito no protocolo DB-ALM n.° 158 h-CLAT (18), pode afetar os resultados. Após terem sido lavadas duas ou mais vezes com 150 μl de tampão de coloração, as células são novamente colocadas em

▼M8

suspensão no tampão de coloração (por exemplo, 400 µl), sendo acrescentada a solução de IP (por exemplo, 20 µl para obter uma concentração final de 0,625 µg/ml) ou um outro marcador de citotoxicidade (ver ponto 18). Os níveis de expressão de CD86 e de CD54 e a viabilidade celular são analisados por citometria de fluxo.

DADOS E RELATÓRIOS

Avaliação dos dados

25. O nível de expressão de CD86 e CD54 é analisado por citometria de fluxo com o canal de aquisição FL-1. Com base na média geométrica da intensidade de fluorescência (IMF, intensidade média de fluorescência), a intensidade relativa de fluorescência (IRF) de CD86 e de CD54 para as células com controlo (ctrl) positivo e para as células tratadas com o produto químico é calculada utilizando a seguinte equação:

$$RFI = \frac{MFI\ cél.tratadas\ com\ prod.quím. - MFI\ cél.ctrl\ do\ isótipo\ tratadas\ com\ prod.quím.}{MFI\ cél.ctrl\ do\ isótipo\ tratadas\ solvente/veículo - MFI\ cél.ctrl\ do\ isótipo\ tratadas\ solvente/veículo} \times 100$$

A viabilidade celular das células de controlo (ctrl) do isótipo [coradas com anticorpos de ratinho IgG1 (isótipo)] também é calculada de acordo com a equação descrita no ponto 19.

Modelo preditivo

26. Para determinar a expressão de *CD86/CD54*, cada produto químico em estudo é testado em, pelo menos, duas execuções independentes para obter uma previsão única (POSITIVA ou NEGATIVA). Uma previsão por h-CLAT é considerada POSITIVA se for preenchida pelo menos uma das seguintes condições em duas de duas ou em pelo menos duas de três execuções independentes; caso contrário, a previsão por h-CLAT é considerada NEGATIVA (figura 1):

— A IRF de CD86 é igual ou superior a 150 % a qualquer concentração testada (com viabilidade celular ≥ 50 %);

— A IRF de CD54 é igual ou superior a 200 % a qualquer concentração testada (com viabilidade celular ≥ 50 %).

27. Atendendo ao que precede, se as duas primeiras execuções forem ambas positivas para CD86 e/ou forem ambas positivas para CD54, a previsão por h-CLAT é considerada POSITIVA e não é necessário efetuar uma terceira execução. Do mesmo modo, se as duas primeiras execuções forem negativas para ambos os marcadores, a previsão por h-CLAT é considerada NEGATIVA (tendo devidamente em conta o disposto no ponto 30), não sendo necessário efetuar uma terceira execução. Se, no entanto, as duas primeiras execuções não forem concordantes em relação a pelo menos um dos marcadores (CD54 ou CD86), é necessário realizar uma terceira execução e a previsão final basear-se-á no resultado obtido na maioria das três execuções individuais (ou seja, dois de três). A este respeito, importa notar que, se forem efetuadas duas execuções independentes e uma só for positiva para CD86 (a seguir designada P_1) e a outra só for positiva para CD54 (a seguir designada P_2), é necessário realizar uma terceira execução. Se esta terceira execução for negativa para ambos os marcadores (a seguir designada N), a previsão por h-CLAT é considerada NEGATIVA. Em contrapartida, se a terceira execução for positiva para um dos marcadores (P_1 ou P_2) ou para ambos os marcadores (a seguir designada P_{12}), a previsão por h-CLAT é considerada POSITIVA.

▼**M8**

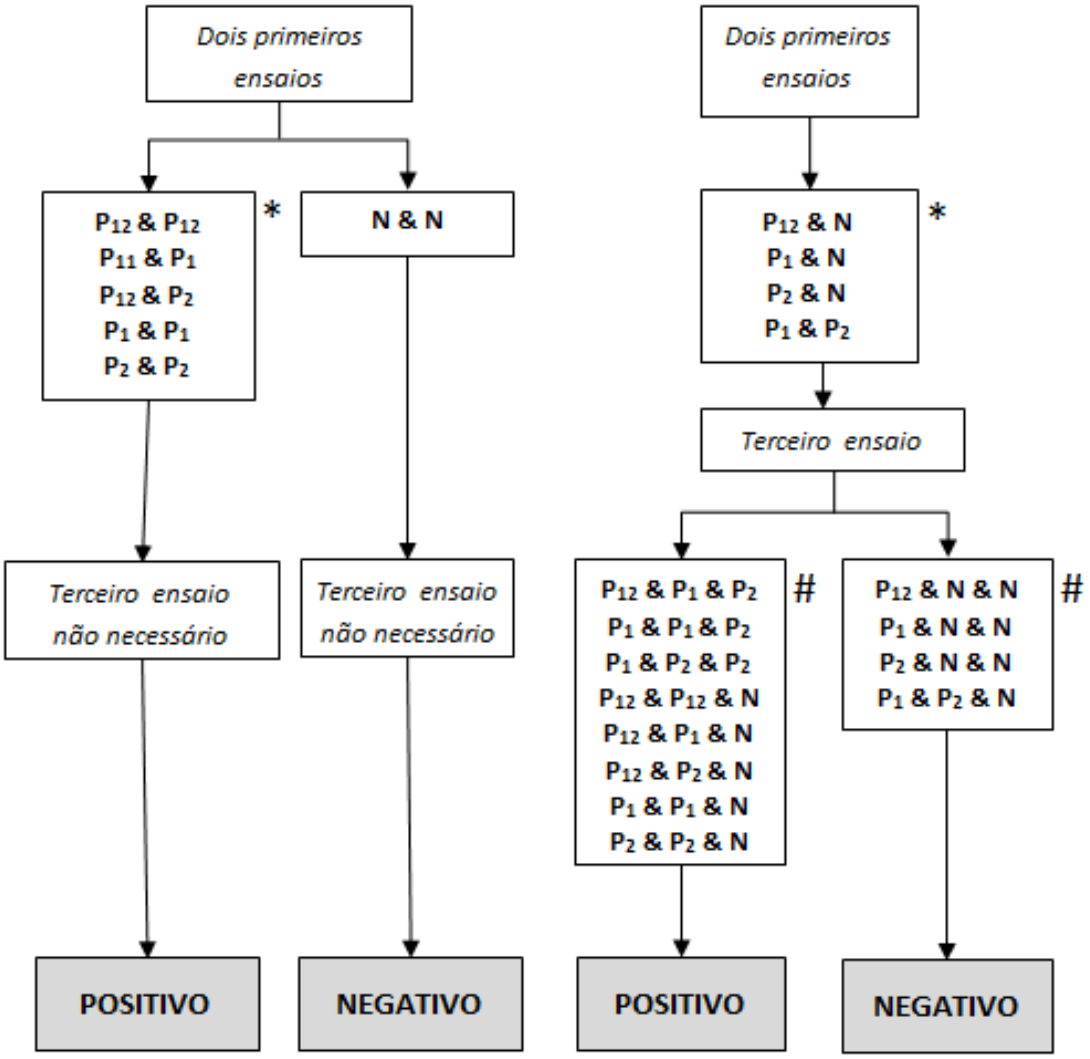


Figura 1: Modelo preditivo usado no método h-CLAT. Uma previsão por h-CLAT deve ser analisada no âmbito de uma IATA e em conformidade com o disposto nos pontos 7 e 8 da Introdução Geral.

P_1: execução positiva apenas para CD86; P_2; execução positiva apenas para CD54; P_{12}: execução positiva para CD86 e CD54; N: execução não positiva para CD86 nem para CD54.

* As caixas mostram as combinações pertinentes de resultados das duas primeiras execuções, independentemente da ordem de obtenção dos resultados.

As caixas mostram as combinações pertinentes de resultados das três execuções com base nos resultados obtidos nas duas primeiras execuções indicados na caixa acima, mas não refletem a ordem de obtenção dos resultados.

28. No caso dos produtos químicos em estudo que se prevê sejam POSITIVOS com o h-CLAT, podem determinar-se dois valores de concentração efetiva (CE), CE150 para CD86 e CE200 para CD54, ou seja, a concentração à qual os produtos químicos em estudo produzem uma IRF de 150 ou 200. Estes valores CE podem contribuir para a avaliação do potencial de sensibilização (9) no âmbito de uma abordagem integrada do tipo IATA (4) (5) (6) (7) (8). Podem ser calculados utilizando as seguintes equações:

▼M8

$$EC\ 150\ (for\ CD86) = B_{conc} + [(150 - B_{RFI})/A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{conc} - B_{conc})]$$

$$EC\ 200\ (for\ CD86) = B_{conc} + [(200 - B_{RFI})/A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{conc} - B_{conc})]$$

em que

A_{conc} é a concentração mais baixa em µg/ml com IRF > 150 (CD86) ou 200 (CD54)

B_{conc} é a concentração mais elevada em µg/ml com IRF < 150 (CD86) ou 200 (CD54)

A_{IRF} é a IRF à concentração mais baixa com IRF > 150 (CD86) ou 200 (CD54)

B_{IRF} é a IRF à concentração mais elevada com IRF < 150 (CD86) ou 200 (CD54)

Para determinar de modo mais preciso os valores CE150 e CE200, podem ser necessárias três execuções independentes para a *medição da expressão de CD86/CD54*. Os valores CE150 e CE200 finais são, então, determinados como o valor mediano das CE calculado a partir das três execuções independentes. Se apenas duas das três execuções independentes satisfizerem os critérios de positividade (ver pontos 26 e 27), é adotado o valor CE150 ou CE200 mais elevado.

Critérios de aceitação

29. Os critérios de aceitação a seguir indicados devem ser respeitados ao utilizar o método h-CLAT (22) (27).

— Os valores de viabilidade celular dos controlos do meio e do solvente/ /veículo devem ser superiores a 90 %.

— Para o controlo do solvente/veículo, as IRF de CD86 e de CD54 não devem exceder os critérios positivos (CD86 IRF ≥ 150 % e CD54 IRF ≥ 200 %). Os valores de IRF para o controlo do solvente/veículo são calculados utilizando a fórmula indicada no ponto 25 (substituindo a menção «IMF do produto químico» por «IMF do solvente/veículo» e «IMF do solvente/veículo» por «IMF do controlo (meio)»).

— Para o controlo do meio e do solvente/veículo, os rácios da IMF CD86 e CD54 para o controlo de isótipo devem ser > 105 %.

— Para o controlo positivo (DNCB), os valores IRF de CD86 e de CD54 devem cumprir os critérios positivos (CD86 IRF ≥ 150 e CD54 IRF ≥ 200) e a viabilidade celular deve ser superior a 50 %.

— Para o produto químico em estudo, a viabilidade celular deve ser superior a 50 % em, pelo menos, quatro concentrações testadas em cada execução.

30. Os resultados negativos só são aceitáveis no caso de produtos químicos em estudo que apresentem uma viabilidade celular inferior a 90 % à concentração mais elevada testada (ou seja, 1,2 × CV75 de acordo com o esquema de diluições em série descrito no ponto 20). Se a viabilidade celular a 1,2 × CV75 for igual ou superior a 90 %, o resultado negativo não deve ser tido em conta. Neste caso, é recomendável tentar aperfeiçoar a seleção das doses repetindo a determinação do valor CV75. Note-se que, quando uma concentração de 5 000 µg/ml na solução salina (ou no meio ou outros solventes/ /veículos), uma concentração de 1 000 µg/ml em DMSO ou a concentração solúvel mais elevada é utilizada como concentração máxima de ensaio para um produto químico em estudo, pode aceitar-se um resultado negativo mesmo que a viabilidade celular seja superior a 90 %.

▼M8

Relatório de ensaio

31. O relatório de ensaio deve incluir as informações que a seguir se indicam.

Produto químico em estudo

Substância monocomponente

— Identificação química, como o(s) nome(s) IUPAC ou CAS, o(s) número(s) CAS, o código SMILES ou InChI, a fórmula estrutural e/ou outros identificadores;

— Aspeto físico, log P, solubilidade na água, solubilidade em DMSO, massa molecular e outras propriedades físico-químicas relevantes, se disponíveis;

— Grau de pureza, identidade química das impurezas, conforme adequado e exequível, etc.;

— Pré-tratamento, se for o caso (aquecimento ou moagem, por exemplo);

— Concentração(ões) testada(s);

— Condições de armazenagem e de estabilidade, se conhecidas;

— Justificação da escolha do solvente/veículo para cada produto químico em estudo.

Substância multicomponentes, UVCB e mistura

— Caracterização, tanto quanto possível, por exemplo, por identidade química (ver *supra*), pureza, ocorrência quantitativa e propriedades físico-químicas relevantes (ver *supra*) dos componentes, na medida em que estejam disponíveis;

— Aspeto físico, solubilidade na água, solubilidade em DMSO e outras propriedades físico-químicas relevantes, na medida em que estejam disponíveis;

— Massa molecular, ou massa molecular aparente no caso de misturas/polímeros de composições conhecidas, ou outras informações relevantes para a realização do estudo;

— Pré-tratamento, se for o caso (aquecimento ou moagem, por exemplo);

— Concentração(ões) testada(s);

— Condições de armazenagem e de estabilidade, se conhecidas;

— Justificação da escolha do solvente/veículo para cada produto químico em estudo.

Controlos

Controlo positivo

— Identificação química, como o(s) nome(s) IUPAC ou CAS, o(s) número(s) CAS, o código SMILES ou InChI, a fórmula estrutural e/ou outros identificadores;

— Aspeto físico, log P, água, solubilidade na água, solubilidade em DMSO, massa molecular e outras propriedades físico-químicas relevantes, se conhecidas e se aplicável;

— Grau de pureza, identidade química das impurezas, conforme adequado e exequível, etc.;

▼**M8**

— Pré-tratamento, se for o caso (aquecimento ou moagem, por exemplo);

— Concentração(ões) testada(s);

— Condições de armazenagem e de estabilidade, se conhecidas;

— Referência ao historial dos resultados dos controlos positivos que demonstrem o cumprimento dos critérios de aceitação da execução, se aplicável.

Controlo negativo e controlo do solvente/veículo

— Identificação química, como o(s) nome(s) IUPAC ou CAS, o(s) número(s) CAS, o código SMILES ou InChI, a fórmula estrutural e/ou outros identificadores;

— Grau de pureza, identidade química das impurezas, conforme adequado e exequível, etc.;

— Aspeto físico, massa molecular e outras propriedades físico-químicas relevantes caso seja utilizado um solvente/veículo diferente dos mencionados nas orientações de ensaio, na medida em que estejam disponíveis;

— Condições de armazenagem e de estabilidade, se conhecidas;

— Justificação da escolha do solvente/veículo para cada produto químico em estudo.

Condições de ensaio

— Nome e endereço do promotor, do laboratório e do diretor do estudo;

— Descrição do ensaio utilizado;

— Linha celular utilizada, respetivas condições de armazenamento e origem (por exemplo, instalação de onde provêm as células);

— Citometria de fluxo utilizada (por exemplo, modelo), incluindo parâmetros dos instrumentos, globulina, anticorpos e marcador de citotoxicidade utilizados;

— O procedimento utilizado para demonstrar a competência do laboratório na realização do ensaio, mediante o teste de substâncias para demonstração de competência, e o procedimento utilizado para demonstrar a reprodutibilidade do desempenho do ensaio ao longo do tempo, por exemplo dados históricos do controlo e/ou dados históricos dos controlos de reatividade.

Critérios de aceitação do ensaio

— Viabilidade celular, valores IMF e IRF obtidos com o controlo do solvente/veículo comparativamente com os intervalos de aceitação;

— Viabilidade celular e valores IRF obtidos com o controlo positivo comparativamente com os intervalos de aceitação;

— Viabilidade celular de todas as concentrações testadas do produto químico em estudo.

▼**M8**

Procedimento de ensaio

— Número de execuções realizadas;

— Concentrações do produto químico em estudo, aplicação e tempo de exposição utilizado (se diferente do recomendado);

— Descrição dos critérios de avaliação e de decisão utilizados;

— Descrição de eventuais modificações do procedimento de ensaio.

Resultados

— Quadro com os dados, incluindo o valor CV75 (se aplicável), a IMF geométrica individual, a IRF, valores de viabilidade celular, valores CE1 50/CE200 (se aplicável) obtidos para o produto químico em estudo e para o controlo positivo em cada execução, bem como uma indicação da classificação do produto químico em estudo segundo o modelo preditivo;

— Descrição de quaisquer outras observações pertinentes, se for caso disso.

Discussão dos resultados

— Discussão dos resultados obtidos com o método h-CLAT;

— Análise dos resultados do ensaio no contexto de uma IATA, caso estejam disponíveis outras informações pertinentes.

Conclusões

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(1) Ashikaga T, Yoshida Y, Hirota M, Yoneyama K, Itagaki H, Sakaguchi H, Miyazawa M, Ito Y, Suzuki H, Toyoda H. (2006). Development of an *in vitro* skin sensitization test using human cell lines: The human Cell Line Activation Test (h-CLAT) I. Optimization of the h-CLAT protocol. Toxicol. *In Vitro* 20, 767–773.

(2) Miyazawa M, Ito Y, Yoshida Y, Sakaguchi H, Suzuki H. (2007). Phenotypic alterations and cytokine production in THP-1 cells in response to allergens. Toxicol. *In Vitro* 21, 428-437.

(3) EC EURL-ECVAM (2013). Recommendation on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for skin sensitisation testing. Disponível em: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations

(4) Takenouchi O, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Hirota M, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Test battery with the human cell line activation test, direct peptide reactivity assay and DEREK based on a 139 chemical data set for predicting skin sensitizing potential and potency of chemicals. J Appl Toxicol. 35, 1318-1332.

(5) Hirota M, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Takenouchi O, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Evaluation of combinations of *in vitro* sensitization test descriptors for the artificial neural network-based risk assessment model of skin sensitization. J Appl Toxicol. 35, 1333-1347.

(6) Bauch C, Kolle SN, Ramirez T, Fabian E, Mehling A, Teubner W, van Ravenzwaay B, Landsiedel R. (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potencials. Regul Toxicol Parmacol. 63, 489-504.

▼**M8**

(7) Van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natch A, van Loveren H, Ezendam J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. Regul Toxicol Pharmacol. 69, 371-379.

(8) Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, Natsch A, Emter R, Ashikaga T, Miyazawa M, Sakaguchi H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. Regul Toxicol Parmacol. 71, 337-351.

(9) Jaworska JS, Natsch A, Ryan C, Strickland J, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Bayesian integrated testing strategy (ITS) for skin sensitization potency assessment: a decision support system for quantitative weight of evidence and adaptive testing strategy. Arch Toxicol. 89, 2355-2383.

(10) Strickland J, Zang Q, Kleinstreuer N, Paris M, Lehmann DM, Choksi N, Matheson J, Jacobs A, Lowit A, Allen D, Casey W. (2016). Integrated decision strategies for skin sensitization hazard. J Appl Toxicol. DOI 10.1002/jat.3281.

(11) Nukada Y, Ashikaga T, Miyazawa M, Hirota M, Sakaguchi H, Sasa H, Nishiyama N. (2012). Prediction of skin sensitization potency of chemicals by human Cell Line Activation Test (h-CLAT) and an attempt at classifying skin sensitization potency. Toxicol. *In Vitro* 26, 1150-60.

(12) EC EURL ECVAM (2015). Re-analysis of the within and between laboratory reproducibility of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT). Disponível em: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-human-cell-line-activation-test-h-clat-for-skin-sensitisation-testing

(13) EC EURL ECVAM (2012). human Cell Line Activation Test (h-CLAT) Validation Study Report. Disponível em: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/ /eurl-ecvam-recommendations

(14) Takenouchi O, Miyazawa M, Saito K, Ashikaga T, Sakaguchi H. (2013). Predictive performance of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for lipophilic with high octanol-water partition coefficients. J. Toxicol. Sci. 38, 599-609.

(15) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, NishiyamaN, Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). Altern. Lab. Anim. 38, 275-284.

(16) Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. (2013). Xenobiotic metabolizin enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. Arch Toxicol 87, 1683-1969.

(17) Okamoto K, Kato Y, Kosaka N, Mizuno M, Inaba H, Sono S, Ashikaga T, Nakamura T, Okamoto Y, Sakaguchi H, Kishi M, Kuwahara H, Ohno Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h--CLAT) for predicting skin sensitization potential (6th report): A study for evaluating oxidative hair dye sensitization potential using h-CLAT. AATEX 15, 81-88.

(18) DB-ALM (INVITTOX) (2014). Protocol 158: human Cell Line Activation Test (h-CLAT), 23pp. Disponível em: http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/

▼**M8**

(19) Mizuno M, Yoshida M, Kodama T, Kosaka N, Okamato K, Sono S, Yamada T, Hasegawa S, Ashikaga T, Kuwahara H, Sakaguchi H, Sato J, Ota N, Okamoto Y, Ohno Y. (2008). Effects of pre-culture conditions on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) results; Results of the 4th Japanese inter-laboratory study. AATEX 13, 70-82.

(20) Sono S, Mizuno M, Kosaka N, Okamoto K, Kato Y, Inaba H, Nakamura T, Kishi M, Kuwahara H, Sakaguchi H, Okamoto Y, Ashikaga T, Ohno Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (7^{th} report): Evaluation of volatile, poorly soluble fragrance materials. AATEX 15, 89-96.

(21) OECD (2005). Guidance Document No 34 on The Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Series on Testing and Assessment. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, França, 2005, 96 pp.

(22) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No 168. Disponível em: http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En

(23) United Nations UN (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition. Nova Iorque e Genebra: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Disponível em: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html

(24) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No 87).

(25) Ashikaga T, Sakaguchi H, Okamoto K, Mizuno M, Sato J, Yamada T, Yoshida M, Ota N, Hasegawa S, Kodama T, Okamoto Y, Kuwahara H, Kosaka N, Sono S, Ohno Y. (2008). Assessment of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for Skin Sensitization; Results of the First Japanese Inter-laboratory Study. AATEX 13, 27-35.

▼**M8**

Apêndice 1.1

DEFINIÇÕES

AOP (*Adverse Outcome Pathway* – via determinante dos efeitos nocivos): Sequência de eventos que parte da estrutura química de um produto químico alvo ou de um grupo de produtos químicos análogos, passa pelo evento molecular iniciador, e resulta num resultado com consequências *in vivo* (22).

CE150: Concentrações que apresentam IRF de 150 para a expressão de CD86.

CE200: Concentrações que apresentam IRF de 200 para a expressão de CD54.

Citometria de fluxo: Técnica citométrica em que células em suspensão num fluido passam, uma a uma, por um foco de excitação luminosa, disperso em padrões característicos das células e dos seus componentes; as células são frequentemente marcadas com marcadores fluorescentes para que a luz seja primeiro absorvida e depois emitida a uma frequência diferente.

Controlo do meio: Replicado não tratado que contém todos os componentes de um sistema de ensaio. Esta amostra é tratada com amostras tratadas com o produto químico em estudo e outras amostras de controlo, para determinar se o solvente/veículo interage com o sistema de ensaio.

Controlo positivo: Replicado que contém todos os componentes de um sistema de ensaio e foi tratado com uma substância conhecida por induzir uma resposta positiva. Para que seja possível determinar a variabilidade no tempo da resposta do controlo positivo, a magnitude da resposta positiva não deve ser excessiva.

Controlo do solvente/veículo: Amostra não tratada que contém todos os componentes de um sistema de ensaio, com exceção do produto químico em estudo, mas incluindo o solvente/veículo utilizado. Serve para determinar a resposta de referência para as amostras tratadas com o produto químico em estudo dissolvido ou em dispersão estável no mesmo solvente/veículo. Quando testada simultaneamente com um controlo de meio, esta amostra também indica se o solvente/ /veículo interage com o sistema de ensaio.

CV75: Concentração estimada que apresenta uma viabilidade celular de 75 %.

Ensaio válido: Um ensaio considerado suficientemente pertinente e fiável para um fim específico e que se baseia em princípios cientificamente sólidos. Um ensaio nunca é válido em termos absolutos, mas apenas em relação a um objetivo definido (21).

Especificidade: Proporção dos produtos químicos negativos/inativos que são corretamente classificados pelo ensaio. Permite medir a precisão de um ensaio que produz resultados categóricos e é um aspeto importante a ter em conta na avaliação da pertinência de um ensaio (21).

Execução: Consiste em testar um ou mais produtos químicos em estudo em simultâneo com um controlo do solvente/veículo e com um controlo positivo.

Fiabilidade: Indica em que medida um ensaio pode ser reproduzido ao longo do tempo num mesmo laboratório e entre laboratórios utilizando o mesmo protocolo. Para a avaliar, calcula-se a reprodutibilidade intralaboratorial e interlaboratorial, bem como a repetibilidade intralaboratorial (21).

IATA (*Integrated Approach to Testing and Assessment* – abordagem integrada de ensaio e avaliação): Abordagem estruturada utilizada para a identificação (potencial) e caracterização (potência) do perigo e/ou para a avaliação da segurança (potencial/potência e exposição) de um produto químico ou grupo de produtos químicos, que integra e pondera, de forma estratégica, todos os dados pertinentes com o objetivo de ser tida em conta numa decisão regulamentar sobre o potencial perigo e/ou risco e/ou a necessidade de realizar ensaios complementares específicos.

▼M8

Intensidade relativa de fluorescência (IRF): Valores relativos da média geométrica da intensidade de fluorescência (IMF) das células tratadas com o produto químico em comparação com a IMF das células tratadas com o solvente/veículo.

Mistura: Uma mistura ou solução composta por duas ou mais substâncias.

Perigo: Propriedade intrínseca de um agente, ou de uma situação, suscetível de causar efeitos nocivos quando um organismo, sistema ou (sub)população é exposto ao agente em causa.

Pertinência: Descrição da relação do ensaio com o efeito em estudo e da adequação e utilidade do ensaio para um fim específico. Traduz a medida em que o ensaio mede ou prevê corretamente o efeito biológico em causa. A pertinência tem em conta a precisão (concordância) de um ensaio (21).

Precisão: Grau de acordo entre os resultados do ensaio e os valores de referência aceites. Trata-se de uma medida do desempenho do ensaio e de um dos aspetos da sua pertinência. Este termo e o termo «concordância» são muitas vezes utilizados indistintamente para indicar a proporção de resultados corretos de um ensaio (21).

Pré-haptenos: Produtos químicos que se tornam sensibilizantes por transformação abiótica.

Pró-haptenos: Produtos químicos que requerem ativação enzimática para exercerem potencial de sensibilização cutânea.

Produto químico: Uma substância ou mistura.

Produto químico em estudo: Qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado o presente método.

Sensibilidade: Proporção de todos os produtos químicos positivos/ativos que são corretamente classificados pelo ensaio. Permite medir a precisão de um ensaio que produz resultados categóricos e é um aspeto importante a ter em conta na avaliação da pertinência de um ensaio (21).

Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos das Nações Unidas – GHS da ONU (em inglês: United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals – UN GHS): Sistema que propõe a classificação dos produtos químicos (substâncias e misturas) em função de tipos e níveis normalizados de perigos físicos, sanitários e ambientais e trata dos elementos de comunicação correspondentes, nomeadamente pictogramas, palavras-sinal, advertências de perigo, recomendações de prudência e fichas de dados de segurança, de modo a transmitir informações sobre os respetivos efeitos nocivos, tendo em vista a proteção das pessoas (incluindo empregadores, trabalhadores, transportadores, consumidores e pessoal dos serviços de emergência) e do ambiente (23).

Substância: Um elemento químico e seus compostos, no estado natural ou obtidos por qualquer processo de produção, incluindo qualquer aditivo necessário para preservar a sua estabilidade e quaisquer impurezas resultantes do processo utilizado, mas excluindo qualquer solvente que possa ser separado sem afetar a estabilidade da substância nem alterar a sua composição.

Substância monocomponente: Uma substância, definida pela sua composição quantitativa, da qual um dos principais componentes está presente num teor de, pelo menos, 80 % (m/m).

▼**M8**

Substância multicomponentes: Uma substância, definida pela sua composição quantitativa, da qual mais do que um dos principais componentes está presente numa concentração ≥ 10 % (m/m) e < 80 % (m/m). As substâncias multicomponentes resultam de processos de fabrico. A diferença entre uma mistura e uma substância multicomponentes é que a primeira se obtém misturando duas ou mais substâncias, sem reação química. As substâncias multicomponentes resultam de reações químicas.

Tampão de coloração: Uma solução salina de tampão fosfato com 0,1 % de albumina de soro bovino.

UVCB: Substâncias de composição desconhecida ou variável, produtos de reação complexos ou materiais biológicos.

▼M8

Apêndice 1.2

SUBSTÂNCIAS PARA A DEMONSTRAÇÃO DE COMPETÊNCIA

Antes de utilizarem, por rotina, o ensaio descrito no presente apêndice do método de ensaio B.71, os laboratórios devem demonstrar a sua competência técnica obtendo corretamente a previsão esperada com o método h-CLAT para as dez substâncias recomendadas no quadro 1 e obtendo valores CV75, CE150 e CE200 que se encontrem dentro do intervalo de referência correspondente para, pelo menos, oito das dez substâncias de demonstração de competência. Estas substâncias foram selecionadas de modo a representarem o conjunto de respostas possíveis no que diz respeito aos perigos de sensibilização cutânea. Outros critérios de seleção foram a disponibilidade comercial das substâncias e a disponibilidade de dados de referência *in vivo* de elevada qualidade, bem como de dados *in vitro* de alta qualidade produzidos com o método h-CLAT. Além disso, estão disponíveis dados de referência publicados para o método h-CLAT (3) (14).

Quadro 1

Substâncias recomendadas para a demonstração de competência técnica com o método h-CLAT

Substâncias para a demonstração de competência	N.º CAS	Estado físico	Previsão *in vivo* (1)	Intervalo de referência CV75 em µg/ml (2)	Resultados h-CLAT para CD86 (intervalo de referência CE150 em µg/ml) (2)	Resultados h-CLAT para CD54 (intervalo de referência CE200 em µg/ml) (2)
2,4-Dinitroclorobenzeno	97-00-7	Sólido	Sensibilizante (extremo)	2-12	Positivo (0,5-10)	Positivo (0,5-15)
4-Fenilenodiamina	106-50-3	Sólido	Sensibilizante (forte)	5-95	Positivo (< 40)	Negativo (> 1,5) (3)
Sulfato de níquel	10101-97-0	Sólido	Sensibilizante (moderado)	30-500	Positivo (< 100)	Positivo (10-100)
2-Mercaptobenzotiazol	149-30-4	Sólido	Sensibilizante (moderado)	30-400	Negativo (> 10) (3)	Positivo (10-140)
R(+)-Limoneno	5989-27-5	Líquido	Sensibilizante (fraco)	> 20	Negativo (> 5) (3)	Positivo (< 250)
Imidazolidinilureia	39236-46-9	Sólido	Sensibilizante (fraco)	25-100	Positivo (20-90)	Positivo (20-75)
Isopropanol	67-63-0	Líquido	Não sensibilizante	> 5 000	Negativo (> 5 000)	Negativo (> 5 000)
Glicerol	56-81-5	Líquido	Não sensibilizante	> 5 000	Negativo (> 5 000)	Negativo (> 5 000)
Ácido láctico	50-21-5	Líquido	Não sensibilizante	1500-5 000	Negativo (> 5 000)	Negativo (> 5 000)
Ácido 4-aminobenzoico	150-13-0	Sólido	Não sensibilizante	> 1 000	Negativo (> 1 000)	Negativo (> 1 000)

Abreviaturas: N.º CAS = Número de registo do Chemical Abstracts Service

(1) A previsão de perigo (e potência) *in vivo* baseia-se em dados LLNA (3) (14). A potência *in vivo* é determinada utilizando os critérios propostos pelo ECETOC (24).

(2) Com base em valores históricos observados (13) (25).

(3) Historicamente, a maioria dos resultados negativos foi obtida para este marcador, pelo que se espera, em grande parte, um resultado negativo. O intervalo indicado foi definido com base nos poucos resultados positivos históricos observados. Se for obtido um resultado positivo, o valor CE deve situar-se dentro do intervalo de referência indicado.

▼**M8**

Apêndice 2

SENSIBILIZAÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO*: TESTE DE ATIVAÇÃO DA LINHA CELULAR U937 (U-SENS™)

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES

1. O método de ensaio U-SENS™ permite quantificar as variações na expressão de um marcador de superfície celular associadas ao processo de ativação dos monócitos e das células dendríticas (ou seja, CD86), na linha celular do linfoma histiocítico humano U937, após a exposição a sensibilizantes (1). Os níveis de expressão medidos para o marcador de superfície celular CD86 na linha celular U937 são, em seguida, utilizados para ajudar a distinguir os sensibilizantes dos não sensibilizantes cutâneos.

2. O método de ensaio U-SENS™ foi avaliado num estudo de validação (2) coordenado pela L'Oréal, seguido de uma análise independente pelos pares conduzida pelo Comité Científico Consultivo (ESAC) do Laboratório de Referência da União Europeia para as Alternativas à Experimentação em Animais (EURL ECVAM) (3). Tendo em conta todos os dados disponíveis e os contributos das entidades reguladoras e das partes interessadas, o método de ensaio U-SENS™ foi recomendado pelo EURL ECVAM (4) para ser utilizado no âmbito de uma IATA para ajudar a distinguir os sensibilizantes dos não sensibilizantes para efeitos de classificação e rotulagem de perigos. No seu documento de orientação relativo à elaboração de relatórios sobre as abordagens estruturadas de integração de dados e de utilização de fontes individuais de informação no âmbito de uma IATA para a sensibilização cutânea, a OCDE analisa atualmente vários estudos de casos que descrevem diferentes estratégias de ensaio e modelos preditivos. Uma das diferentes abordagens definidas baseia-se no ensaio U-SENS (5). Encontram-se na literatura (4) (5) (7) exemplos da utilização de dados U-SENS™ combinados com outras informações, incluindo dados históricos e dados humanos válidos (6).

3. O método de ensaio U-SENS™ demonstrou ser transferível para laboratórios com experiência em técnicas de cultura celular e análise por citometria de fluxo. O nível de reprodutibilidade esperado das previsões efetuadas pelo ensaio é da ordem dos 90 % intralaboratorial e 84 % interlaboratorial (8). Os resultados do estudo de validação (8) e de outros estudos publicados (1) indicam, em termos gerais, que, em comparação com os resultados obtidos pelo método LLNA, a precisão na distinção entre sensibilizantes cutâneos (cat. 1 do GHS da ONU/CLP) e não sensibilizantes é de 86 % (N=166), com uma sensibilidade de 91 % (118/129) e uma especificidade de 65 % (24/37). Em comparação com os resultados obtidos no ser humano, a precisão na distinção entre sensibilizantes (cat. 1 do GHS da ONU/CLP) e não sensibilizantes é de 77 % (N=101), com uma sensibilidade de 100 % (58/58) e uma especificidade de 47 % (20/43). É mais provável que os falsos negativos nas previsões efetuadas com o método U-SENS™ em comparação com o LLNA digam respeito a produtos químicos com potencial de sensibilização cutânea baixo a moderado (subcategoria 1B do GHS da ONU/CLP) do que a produtos químicos com um potencial de sensibilização cutânea elevado (subcategoria 1A do GHS da ONU/CLP) (1) (8) (9). No seu conjunto, estas informações demonstram a utilidade do método U-SENS™ para a identificação dos perigos de sensibilização cutânea. No entanto, os valores relativos à precisão do ensaio U-SENS™ utilizado isoladamente são meramente indicativos, uma vez que o presente método deve ser combinado com outras fontes de informação no contexto de uma IATA e em conformidade com o disposto nos pontos 7 e 8 da Introdução Geral. Além disso, na avaliação de métodos de estudo da sensibilização cutânea que não utilizem animais, deve ter-se em mente que o método LLNA e outros ensaios com animais podem não refletir de forma adequada a situação no ser humano.

▼M8

4. Os dados atualmente disponíveis demonstram que o método U-SENS™ é aplicável a produtos químicos em estudo (incluindo ingredientes cosméticos, tais como conservantes, tensioativos, substâncias ativas, corantes) abrangendo diversos grupos funcionais orgânicos, propriedades físico-químicas, potência de sensibilização cutânea (tal como determinadas por estudos *in vivo*) e o espetro de mecanismos de reação que se sabe estarem associados à sensibilização cutânea (ou seja, aceitador de Michael, formação de base de Schiff, agente acilante, substituição nucleófila bimolecular [SN2] ou substituição nucleófila aromática [SNAr]) (1) (8) (9) (10). O método de ensaio U-SENS™ é aplicável a produtos químicos que sejam solúveis ou que formem uma dispersão estável (ou seja, um coloide ou uma suspensão em que o produto químico não se deposite nem se separe do solvente/veículo formando diferentes fases) num solvente/veículo adequado (ver ponto 13). Os produtos químicos constantes da base de dados assinalados como pré-haptenos (substâncias ativadas por oxidação) ou pró-haptenos (substâncias que requerem ativação enzimática, por exemplo através de enzimas P450) foram corretamente previstos pelo ensaio U-SENS™ (1) (10). As substâncias capazes de provocar a rutura de membranas podem produzir resultados falsos positivos, devido a um aumento não específico da expressão de CD86. Com efeito, três dos sete falsos positivos em relação à classificação de referência *in vivo* eram tensioativos (1). Por isso, os resultados positivos com tensioativos devem ser tratados com prudência, enquanto os resultados negativos com tensioativos podem continuar a ser utilizados para apoiar a identificação do produto químico em estudo como não sensibilizante. É possível avaliar produtos químicos em estudo fluorescentes com o U-SENS™ (1). No entanto, os produtos fortemente fluorescentes que emitem no mesmo comprimento de onda que o isotiocianato de fluoresceína (FITC) ou que o iodeto de propídio (IP) provocam interferência com a deteção por citometria de fluxo, pelo que não podem ser corretamente avaliados utilizando anticorpos conjugados com FITC (potenciais falsos negativos) ou IP (viabilidade não mensurável). Neste caso, é possível recorrer, respetivamente, a outros anticorpos marcados com fluorocromos ou a outros marcadores de citotoxicidade, desde que seja possível demonstrar que produzem resultados semelhantes aos dos anticorpos marcados com FITC ou com IP (ver ponto 18), por exemplo testando as substâncias para demonstração de competência indicadas no apêndice 2.2. À luz do que precede, os resultados positivos com tensioativos e os resultados negativos com produtos químicos em estudo fortemente fluorescentes devem ser interpretados no contexto das limitações indicadas e em conjunto com outras fontes de informação no âmbito da IATA. Nos casos em que seja demonstrado que o ensaio U-SENS™ não é aplicável a outras categorias específicas de produtos químicos em estudo, este ensaio não deve ser utilizado para essas categorias específicas.

5. Tal como descrito acima, o ensaio U-SENS™ ajuda a distinguir os sensibilizantes cutâneos dos não sensibilizantes. No entanto, quando utilizado no âmbito de abordagens integradas do tipo IATA, pode também contribuir para a avaliação do potencial de sensibilização. Contudo, é necessário continuar a trabalhar, de preferência com base em dados humanos, para determinar o modo como os resultados do U-SENS™ poderão vir a ser úteis para este tipo de avaliação.

6. Apresentam-se definições no apêndice 2.1.

PRINCÍPIO DO ENSAIO

7. O método U-SENS™ é um ensaio *in vitro* que permite quantificar as variações da expressão do marcador de superfície celular CD86 numa linha celular do linfoma histiocítico humano – as células U937– após uma exposição de 45 ± 3 horas ao produto químico em estudo. O marcador de superfície CD86 é um marcador típico de ativação das células U937. Trata-se de uma molécula de coestimulação conhecida por ser capaz de simular a ativação monocitária, o que desempenha um papel crítico na ativação das células T. As variações na expressão do marcador de superfície celular CD86 são medidas por citometria de fluxo após coloração das células, geralmente com anticorpos marcados com isotiocianato de fluoresceína (FITC). A citotoxicidade é medida em paralelo (por exemplo, utilizando IP), a fim de determinar se a ativação da expressão do marcador de superfície

▼M8

celular CD86 ocorre a concentrações subcitotóxicas. O índice de estimulação (IE) do marcador de superfície celular CD86, em comparação com o do controlo do solvente/veículo, é calculado e utilizado no modelo preditivo (ver ponto 19) para ajudar a distinguir os sensibilizantes dos não sensibilizantes.

DEMONSTRAÇÃO DE COMPETÊNCIA

8. Antes de utilizarem, por rotina, o ensaio descrito no presente apêndice do método de ensaio B.71, os laboratórios devem demonstrar a sua competência técnica utilizando as dez substâncias enumeradas no apêndice 2.2, em conformidade com as boas práticas para os métodos *in vitro* (11). Além disso, os utilizadores do ensaio devem manter uma base de dados históricos dos controlos de reatividade (ver ponto 11), obtidos com o controlo positivo e com o controlo do solvente/veículo (ver pontos 15 e 16), e utilizar esses dados para confirmar que a reprodutibilidade do método de ensaio no seu laboratório é mantida ao longo do tempo.

PROCEDIMENTO

9. O presente método de ensaio baseia-se no protocolo n.º 183 do serviço de base de dados sobre os métodos alternativos à experimentação em animais (DB-ALM — *DataBase service on ALternative Methods to animal experimentation*) U-SENS™ (12). Devem utilizar-se procedimentos operacionais normalizados (PON) aquando da implementação e utilização do método de ensaio U-SENS™ em laboratório. Pode utilizar-se um sistema automatizado para executar o método de ensaio U-SENS™ se for possível demonstrar que produz resultados semelhantes, por exemplo testando as substâncias enumeradas no apêndice 2.2. Segue-se uma descrição dos principais elementos e procedimentos do método U-SENS™.

Preparação das células

10. Para a realização do ensaio U-SENS™, deve utilizar-se a linha celular do linfoma histiocítico humano, U937 (13). As células (clone CRL1593.2) devem ser obtidas junto de um banco de células reconhecido, como a American Type Culture Collection.

11. As células U937 são cultivadas a 37 °C numa atmosfera humidificada a 5 % CO_2, em meio RPMI-1 640 complementado com 10 % de soro fetal de vitelo (SFV), 2 mM de L-glutamina, 100 unidades/ml de penicilina e 100 μg/ml de estreptomicina (meio completo). As células U937 são passadas regularmente a cada 2-3 dias a uma densidade de 1,5 ou 3×10^5 células/ml, respetivamente. A densidade celular não deve exceder 2×10^6 células/ml e a viabilidade celular medida pela exclusão do azul de Trypan deve ser ≥ 90 % (não deve aplicar-se na primeira passagem após descongelação). Antes de ser utilizado para o ensaio, cada lote de células, de SFV ou de anticorpos deve ser qualificado mediante a realização de um controlo de reatividade. O controlo de reatividade das células deve ser efetuado com o controlo positivo, o ácido picrilsulfónico (ácido 2,4,6-trinitrobenzenossulfónico: TNBS) (n.º CAS 2 508-19-2, pureza ≥ 99 %) e com o controlo negativo, o ácido láctico (n.º CAS 50-21-5, pureza ≥ 85 %), pelo menos uma semana após a descongelação. O controlo de reatividade deve ser efetuado com seis concentrações finais para cada um dos dois controlos (TNBS: 1, 12.5, 25, 50, 75, 100 μg/ml e ácido láctico: 1, 10, 20, 50, 100, 200 μg/ml). O TNBS dissolvido no meio completo deve produzir uma resposta positiva para o CD86, relacionada com a concentração (por exemplo, quando uma concentração positiva, IE CD86 ≥ 150, é seguida por uma concentração com um IE CD86 crescente); o ácido láctico dissolvido no meio completo deve produzir uma resposta negativa para o CD86 (ver ponto 21). Apenas devem ser utilizados para o ensaio os lotes de células que tenham passado duas vezes o controlo de reatividade. As células podem ser propagadas até sete semanas após a descongelação. O número de passagens não deve exceder 21. O controlo de reatividade deve ser efetuado de acordo com os procedimentos descritos nos pontos 18 a 22.

▼M8

12. Para o ensaio, as células U937 são inoculadas a uma densidade de 3×10^5 células/ml ou 6×10^5 células/ml e pré-cultivadas em frascos de cultura durante dois dias ou um dia, respetivamente. Podem utilizar-se condições de pré-cultura diferentes das descritas acima, desde que a escolha seja suficientemente fundamentada do ponto de vista científico e seja possível demonstrar que produz resultados semelhantes, por exemplo testando as substâncias enumeradas no apêndice 2.2. No dia do ensaio, as células colhidas do frasco de cultura são novamente colocadas em suspensão num meio de cultura fresco a uma densidade de 5×10^5 células/ml. Em seguida, distribuem-se as células numa placa de 96 poços de fundo plano com 100 µl (densidade celular final de $0{,}5 \times 10^5$ células/poço).

Preparação dos produtos químicos em estudo e das substâncias de controlo

13. A avaliação da solubilidade deve ser efetuada antes do ensaio. Para este efeito, os produtos químicos em estudo são dissolvidos ou dispersos de forma estável a uma concentração de 50 mg/ml, escolhendo de preferência como solvente o meio completo ou, como segunda opção de solvente/veículo, o dimetilsulfóxido (DMSO, pureza ≥ 99 %), se o produto químico em estudo não for solúvel no meio completo. Para o ensaio, dissolve-se o produto químico em estudo até uma concentração final de 0,4 mg/ml no meio completo, se o produto químico for solúvel neste solvente/veículo. Se apenas for solúvel em DMSO, é dissolvido a uma concentração de 50 mg/ml. É possível utilizar solventes/veículos diferentes dos descritos, desde que a escolha seja fundamentada do ponto de vista científico. Deve ser tida em conta a estabilidade do produto químico em estudo no solvente/ /veículo final.

14. Os produtos químicos em estudo e as substâncias de controlo são preparados no dia do ensaio. Uma vez que não é realizado um ensaio de determinação da dose, devem testar-se, para a primeira execução, seis concentrações finais (1, 10, 20, 50, 100 e 200 µg/ml) no solvente/veículo correspondente, quer no meio completo, quer em DMSO a 0,4 % no meio. Para as execuções seguintes, partindo das soluções do produto químico em estudo a uma concentração de 0,4 mg/ml em meio completo, ou de 50 mg/ml em DMSO, preparam-se pelo menos quatro soluções de trabalho (ou seja, pelo menos quatro concentrações) utilizando o solvente/veículo correspondente. Para terminar, as soluções de trabalho são utilizadas para o tratamento, acrescentando um volume igual de células U937 em suspensão (ver ponto 11 *supra*) ao volume da solução de trabalho na placa para obter uma diluição suplementar de fator 2 (12). As concentrações (pelo menos quatro) para eventuais execuções suplementares são selecionadas com base nos resultados individuais de todas as execuções anteriores (8). As concentrações finais utilizáveis são 1, 2, 3, 4, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180 e 200 µg/ml. A concentração final máxima é de 200 µg/ml. Se for obtido um valor positivo para CD86 a 1 µg/ml, convém avaliar 0,1 µg/ml para encontrar a concentração do produto químico em estudo que não transpõe o limiar de positividade de CD86. Para cada execução, calcula-se o valor CE150 (concentração à qual um produto químico atinge o limiar de positividade de 150 % para CD86, ver ponto 19) se for observada uma resposta positiva para CD86 dependente da concentração. Se o produto químico em estudo induzir uma resposta positiva para CD86 não relacionada com a concentração, o cálculo do valor CE150 pode não ser pertinente, tal como descrito no protocolo DB-ALM n.º 183 U-SENS™ (12). Para cada execução, é calculado, sempre que possível, o valor CV70 (concentração à qual um produto químico atinge o limiar de citotoxicidade de 70 %, ver ponto 19) (12). Para avaliar o efeito de resposta ligada à concentração do aumento de CD86, quaisquer concentrações escolhidas entre as concentrações utilizáveis devem ser repartidas uniformemente entre a CE150 (ou a concentração mais elevada não citotóxica negativa para CD86) e a CV70 (ou a concentração mais elevada permitida, ou seja, de 200 µg/ml). Para efeitos de comparação, devem testar-se, no mínimo, quatro concentrações por execução sendo, pelo menos, duas concentrações comuns à execução ou execuções anteriores.

▼M8

15. O controlo do solvente/veículo utilizado no ensaio U-SENS™ é o meio completo – para os produtos químicos em estudo dissolvidos ou em dispersão estável no meio completo, ver ponto 4 – ou o DMSO a 0,4 % em meio completo – para os produtos químicos em estudo dissolvidos ou em dispersão estável em DMSO.

16. O controlo positivo utilizado no ensaio U-SENS™ é o TNBS (ver ponto 11), preparado em meio completo. O TNBS deve ser utilizado como controlo positivo para a medição da expressão de CD86 a uma concentração final única na placa (50 μg/ml) que produza uma viabilidade celular > 70 %. Para obter uma concentração de 50 μg/ml de TNBS na placa, prepara-se uma solução-mãe de TNBS a 1 M (ou seja, 293 mg/ml) em meio completo, antes de proceder a uma diluição por um fator de 2 930 no meio completo até se obter uma solução de trabalho a 100 μg/ml. O ácido láctico (AL, CAS 50--21-5) deve ser utilizado como controlo negativo, dissolvido a 200 μg/ml no meio completo, a partir de uma solução-mãe a 0,4 mg/ml. Em cada placa de cada execução, preparam-se três replicados de meio completo controlo não tratado, o controlo do solvente/veículo e os controlos negativo e positivo (12). Podem utilizar-se outros controlos positivos adequados se houver dados históricos que permitam definir critérios de aceitação comparáveis para a execução. Os critérios de aceitação da execução são idênticos aos descritos para o produto químico em estudo (ver ponto 12).

Aplicação dos produtos químicos em estudo e das substâncias de controlo

17. O controlo do solvente/veículo ou as soluções de trabalho descritas nos pontos 14 a 16 são misturados na proporção 1:1 (v/v) com as suspensões de células preparadas na placa de 96 poços de fundo plano (ver ponto 12). As placas tratadas são, em seguida, incubadas durante 45 ± 3 horas a 37 °C, 5 % CO_2. Antes da incubação, as placas são seladas com uma membrana semipermeável, para evitar a evaporação de produtos químicos em estudo voláteis e a contaminação cruzada entre células tratadas com os produtos químicos em estudo (12).

Coloração celular

18. Após 45 ± 3 horas de exposição, as células são transferidas para uma placa de microtitulação de fundo cónico e recolhidas por centrifugação. A interferência de solubilidade é definida pela presença de cristais ou gotas visíveis ao microscópio 45 ± 3 horas após o tratamento (antes da coloração celular). Os sobrenadantes são rejeitados e as restantes células são lavadas uma vez com 100 μl de um tampão fosfato salino (TFS) gelado contendo 5 % de soro fetal de vitelo (tampão de coloração). Após centrifugação, as células são novamente colocadas em suspensão em 100 μl de tampão de coloração e coradas com 5 μl (ou seja, 0,25 μg) de anticorpos anti-CD86 ou anticorpos de ratinho (isótipo) IgG1 marcados com FITC a 4 °C durante 30 minutos, ao abrigo da luz. Devem utilizar-se os anticorpos descritos no protocolo DB-ALM n.º 183 U-SENS™ (12) (para CD86: BD-PharMingen #5556 57 Clone: Fun-1, ou Caltag/Invitrogen # MHCD8601 Clone: BU63; e para IgG1: BD-PharMingen #5557 48, ou Caltag/Invitrogen # GM4992). A experiência adquirida aquando do desenvolvimento do ensaio indica que a intensidade da fluorescência dos anticorpos é geralmente coerente entre diferentes lotes. É possível utilizar para o ensaio outros clones ou fornecedor dos anticorpos que tenham passado o controlo de reatividade (ver o ponto 11). No entanto, os utilizadores podem ponderar a possibilidade de proceder à titulação dos anticorpos em condições laboratoriais próprias, a fim de definir a concentração mais adequada. Podem utilizar-se outros sistemas de deteção, por exemplo anticorpos anti-CD86 marcados por outros fluorocromos, desde que seja possível demonstrar que produzem resultados semelhantes aos anticorpos conjugados por FITC, por exemplo testando as substâncias enumeradas no apêndice 2.2. Após duas lavagens com 100 μl de tampão de coloração e uma lavagem com 100 μl de TFS gelado, as células são novamente colocadas em suspensão em TFS gelado (por exemplo, 125 μl para as amostras a analisar manualmente tubo a tubo, ou 50 μl para uma placa de auto-amostragem) e acrescenta-se a solução de IP (concentração final: 3 μg/ml). Podem utilizar-se outros marcadores de citotoxicidade, tais

▼M8

como a 7-aminoactinomicina D (7-AAD) ou o azul de Trypan, desde que se possa demonstrar que produzem resultados semelhantes ao IP, por exemplo testando as substâncias enumeradas no apêndice 2.2.

Análise por citometria de fluxo

19. O nível de expressão de CD86 e a viabilidade celular são analisados por citometria de fluxo. As células são dispostas num gráfico de pontos à escala logarítmica de acordo com o seu tamanho (FSC) e granularidade (CSS), a fim de identificar claramente a população numa primeira janela R1 e eliminar os resíduos. O objetivo consiste em adquirir 10 000 células na janela R1 para cada poço. As células pertencentes a uma mesma janela R1 são representadas num gráfico de pontos FL3 ou FL4/CSS. As células viáveis são identificadas traçando uma segunda janela R2 de seleção da população celular negativa para o iodeto de propídio (canais FL3 ou FL4). Pode calcular-se a viabilidade celular pelo programa de análise do citómetro utilizando a equação indicada em baixo. Se a viabilidade celular for baixa, devem ser adquiridas, no máximo, 20 000 células, incluindo células mortas. Uma outra opção consiste em adquirir os dados durante um minuto após o início da análise.

$$Viabilidade\ celular = \frac{Número\ de\ células\ vivas}{Número\ total\ de\ células\ adquiridas} \times 100$$

A percentagem das células FL1-positivas é, em seguida, medida entre as células viáveis retidas em R2 (dentro de R1). A expressão de CD86 na superfície celular é analisada através de um gráfico de pontos FL1/CSS em células viáveis (R2).

No caso dos poços que contêm meio completo/IgG1, o marcador de análise é fixado próximo da população principal, de modo a que os controlos em meio completo apresentem um valor IgG1 na zona alvo de 0,6 a 0,9 %.

A interferência de cor é definida como uma transferência da dispersão correspondente aos IgG1 marcados com FITC (médio geométrica de IE IgG1 FL1 $\geq$ 150 %).

O índice de estimulação (IE) de CD86 para as células de controlo (não tratadas ou em DMSO a 0,4 %) e para as células tratadas com produtos químicos é calculado pela seguinte equação:.

$$S.I. = \frac{\%\ de\ células\ tratadas\ CD86^{+} - \%\ de\ células\ tratadas\ IgG1^{+}}{\%\ de\ células\ de\ controlo\ CD86^{+} - \%\ de\ células\ de\ controlo\ IgG1^{+}} \times 100$$

% de células de controlo não tratadas $IgG1^{+}$: percentagem de células FL1--positivas reconhecidas pelo IgG1 que ultrapassam o marcador de análise (intervalo de aceitação $\geq$ 0,6 % e < 1,5 %, ver ponto 22) entre as células viáveis não tratadas.

% de células de controlo $IgG1^{+}$/células tratadas $CD86^{+}$: percentagem de células FL1-positivas reconhecidas pelo IgG1/CD86 medida sem deslocar o marcador de análise, entre as células viáveis de controlo/tratadas.

▼M8

DADOS E RELATÓRIOS

Avaliação dos dados

20. Os parâmetros seguintes são calculados no ensaio U-SENS™: valor CV70, isto é, a concentração que produz uma sobrevivência de 70 % das células U937 (30 % de citotoxicidade) e o valor CE150, ou seja, a concentração à qual os produtos químicos em estudo induzem um índice de estimulação (IE) de CD86 de 150 %.

O valor CV70 é calculado por interpolação linear logarítmica utilizando a seguinte equação:

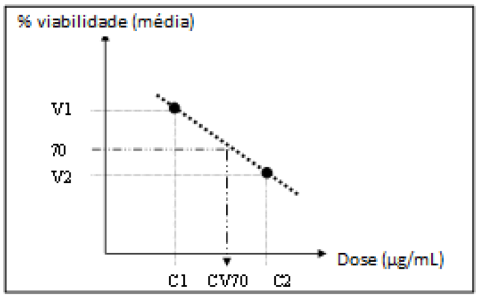
$$CV70 = C1 + [(V1 - 70) / (V1 - V2) * (C2 - C1)]$$

em que:

V1 é o valor mínimo de viabilidade celular superior a 70 %

V2 é o valor máximo de viabilidade celular inferior a 70 %

C1 e C2 são as concentrações que provocam os valores de viabilidade celular V1 e V2, respetivamente.



Podem ser utilizadas outras abordagens para calcular o valor CV70, desde que fique demonstrado que tal não tem qualquer impacto nos resultados – por exemplo, testando as substâncias para demonstração de competência.

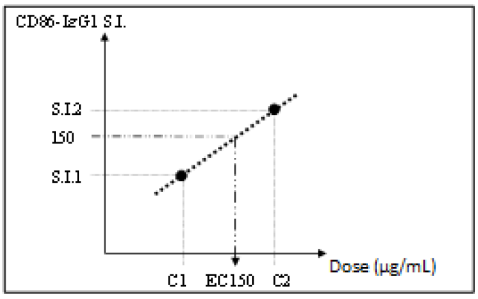
O valor CE150 é calculado por interpolação linear logarítmica utilizando a seguinte equação:

$$CE150 = C1 + [(150 - IE\ 1) / (IE\ 2 - IE\ 1) * (C2 - C1)]$$

Em que:

C1 é a concentração mais elevada em µg/ml com um IE CD86 < 150 % (IE 1)

C2 é a concentração mais baixa em µg/ml com um IE CD86 ≥ 150 % (IE 2)



▼M8

Os valores CE150 e CV70 são calculados

— para cada execução: os valores CE150 e CV70 são utilizados como ferramentas para investigar o efeito de resposta ligada à concentração do aumento de CD86 (ver ponto 14);

— o valor CV70 global é determinado em função da viabilidade média (12);

— o valor CE150 global de um produto químico em estudo que se preveja POSITIVO com o ensaio U-SENS™ é determinado em função dos valores médios de IE CD86 (ver ponto 21) (12).

Modelo preditivo

21. Para a medição de expressão CD86, cada produto químico em estudo é testado em, pelo menos, quatro concentrações e em, pelo menos, duas execuções independentes (efetuadas em dias diferentes) para chegar a uma previsão única (NEGATIVO ou POSITIVO).

— A conclusão individual de uma execução do ensaio U-SENS™ é considerada negativa (a seguir designada por N) se o IE de CD86 for inferior a 150 % a todas as concentrações não citotóxicas (viabilidade celular ≥ 70 %) e se não for observada nenhuma interferência (citotoxicidade, solubilidade: ver ponto 18, ou cor: ver ponto 19, independentemente das concentrações não citotóxicas às quais a interferência é detetada). Em todos os outros casos (para um IE de CD86 superior ou igual a 150 % e/ou interferências observadas), a conclusão individual de uma execução do ensaio U-SENS™ é considerada positiva, sendo a seguir designada por P.

— Uma previsão U-SENS™ é considerada NEGATIVA se, pelo menos, duas execuções independentes forem negativas (N) (figura 1). Se as duas primeiras execuções forem negativas (N), a previsão U-SENS™ é considerada NEGATIVA e não é necessário proceder a uma terceira execução.

— Uma previsão U-SENS™ é considerada POSITIVA se, pelo menos, duas execuções independentes forem positivas (P) (figura 1). Se as duas primeiras execuções forem positivas (P), a previsão U-SENS™ é considerada POSITIVA e não é necessário proceder a uma terceira execução.

— Uma vez que não é realizado um ensaio de determinação da dose, há uma exceção se, na primeira execução, o IE de CD86 for superior ou igual a 150 % apenas à concentração não citotóxica mais elevada. Neste caso, a execução é considerada INCONCLUSIVA (NC), devendo testar-se, em execuções suplementares, concentrações adicionais (entre a concentração mais elevada não citotóxica e a concentração mais baixa citotóxica — ver ponto 20). Se uma execução for identificada como NC, convém realizar pelo menos duas execuções suplementares, e uma quarta execução caso os resultados das execuções 2 e 3 não sejam concordantes (N e/ou P, a título independente) (figura 1). As execuções seguintes serão consideradas positivas mesmo que apenas uma das concentrações não citotóxicas dê um valor de CD86 superior ou igual a 150 %, uma vez que os parâmetros de concentração foram adaptados especificamente a este produto químico em estudo. A previsão final basear-se-á no resultado maioritário das três ou quatro execuções individuais (ou seja, 2 de 3 ou 2 de 4) (figura 1).

▼**M8**

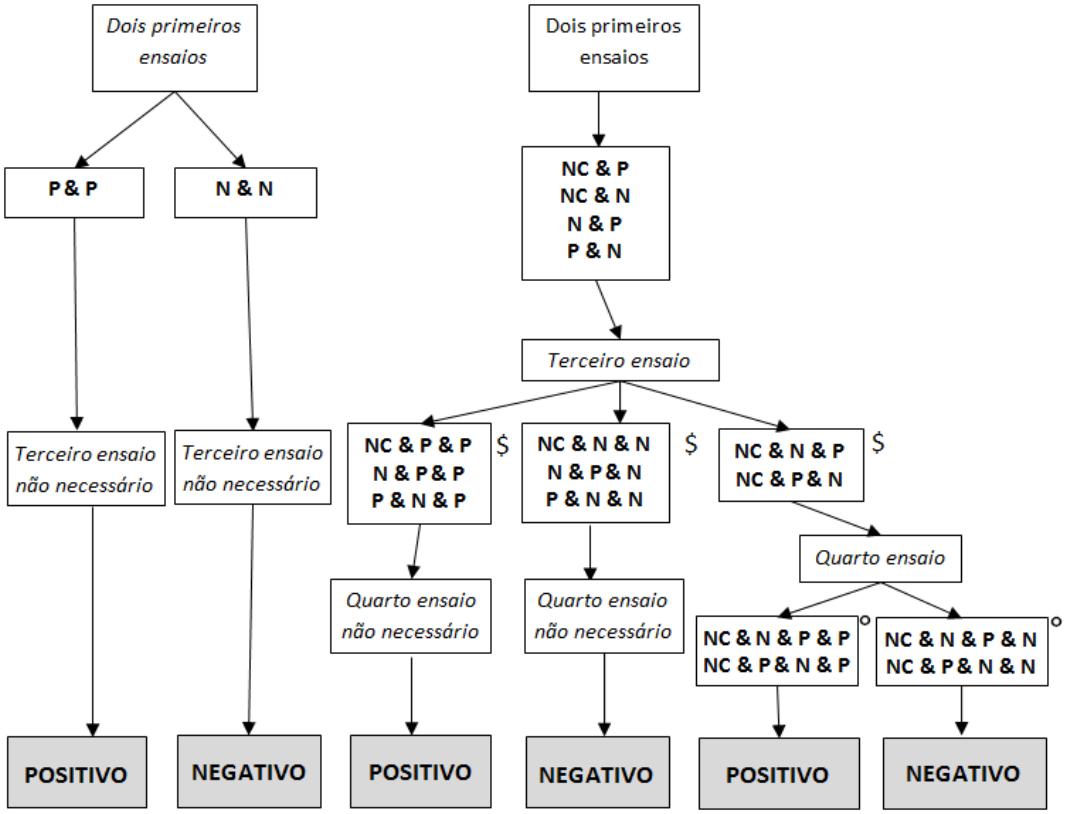


Figura 1: Modelo preditivo utilizado no ensaio U-SENS™. Uma previsão por U-SENS™ deve ser considerada no âmbito de uma IATA e em conformidade com o disposto no ponto 4 e nos pontos 7, 8 e 9 da Introdução Geral.

N: Execução sem resultado positivo para CD86 nem interferência observada.

P: Execução com resultado positivo para CD86 e/ou interferência(s) observada(s).

NC: Inconclusivo. Primeira execução inconclusiva se CD86 for positivo apenas à concentração não citotóxica mais elevada.

#: Um resultado individual inconclusivo (NC) atribuído apenas aquando da primeira execução requer automaticamente uma terceira execução para chegar a uma maioria de conclusões positivas (P) ou negativas (N) em pelo menos duas de três execuções independentes.

$: As caixas mostram as combinações pertinentes de resultados das três execuções com base nos resultados obtidos nas duas primeiras execuções indicados na caixa acima.

°: As caixas mostram as combinações pertinentes de resultados das quatro execuções com base nos resultados obtidos nas três primeiras execuções indicados na caixa acima.

Critérios de aceitação

22. Ao utilizar o método de ensaio U-SENS™ devem respeitar-se os critérios de aceitação a seguir indicados (12).

— Após uma exposição de 45 ± 3 horas, a viabilidade média dos três replicados de células U937 não tratadas deve ser > 90 % e não deve observar-se qualquer deriva da expressão de CD86. A expressão basal de CD86 nas células U937 não tratadas deve estar compreendida entre ≥ 2 % e ≤ 25 %.

▼M8

— Se o solvente utilizado for o DMSO, a sua validade como controlo do veículo é avaliada calculando o IE do DMSO em comparação com o das células não tratadas, devendo a viabilidade média dos três replicados de células ser > 90 %. O controlo de veículo DMSO é válido se o IE médio de CD86 nos três replicados de DMSO for inferior a 250 % do IE médio de CD86 nos três replicados de células U937 não tratadas.

— As execuções são consideradas válidas se, pelo menos, dois dos três valores IgG1 das células U937 não tratadas forem ≥ 0,6 % e < 1,5 %.

— O controlo negativo testado em paralelo (ácido láctico) é considerado válido se, pelo menos, dois dos três replicados forem negativos (IE CD86 < 150 %) e não citotóxicos (viabilidade celular ≥ 70 %).

— O controlo positivo (TNBS) é considerado válido se pelo menos dois dos três replicados forem positivos (IE CD86 ≥ 150 %) e não citotóxicos (viabilidade celular ≥ 70 %).

Relatório de ensaio

23. O relatório de ensaio deve incluir as informações indicadas a seguir.

Produto químico em estudo

Substância monocomponente

— Identificação química, como o(s) nome(s) IUPAC ou CAS, o(s) número(s) CAS, o código SMILES ou InChI, a fórmula estrutural e/ou outros identificadores;

— Aspeto físico, solubilidade no meio completo, solubilidade em DMSO, massa molecular e outras propriedades físico-químicas relevantes, se disponíveis;

— Grau de pureza, identidade química das impurezas, conforme adequado e exequível, etc.;

— Pré-tratamento, se for o caso (aquecimento ou moagem, por exemplo);

— Concentração(ões) testada(s);

— Condições de armazenagem e de estabilidade, se conhecidas;

— Justificação da escolha do solvente/veículo para cada produto químico em estudo.

Substância multicomponentes, UVCB e mistura:

— Caracterização, tanto quanto possível, por exemplo, por identidade química (ver *supra*), pureza, ocorrência quantitativa e propriedades físico-químicas relevantes (ver *supra*) dos componentes, na medida em que estejam disponíveis;

— Aspeto físico, solubilidade no meio completo, solubilidade em DMSO e outras propriedades físico-químicas relevantes, na medida em que estejam disponíveis;

— Massa molecular, ou massa molecular aparente no caso de misturas/polímeros de composições conhecidas, ou outras informações relevantes para a realização do estudo;

— Pré-tratamento, se for o caso (aquecimento ou moagem, por exemplo);

— Concentração(ões) testada(s);

— Condições de armazenagem e de estabilidade, se conhecidas;

— Justificação da escolha do solvente/veículo para cada produto químico em estudo.

▼**M8**

Controlos

Controlo positivo

— Identificação química, como o(s) nome(s) IUPAC ou CAS, o(s) número(s) CAS, o código SMILES ou InChI, a fórmula estrutural e/ou outros identificadores;

— Aspeto físico, solubilidade em DMSO, massa molecular e outras propriedades físico-químicas, se conhecidas e se pertinente;

— Grau de pureza, identidade química das impurezas, conforme adequado e exequível, etc.;

— Pré-tratamento, se for o caso (aquecimento ou moagem, por exemplo);

— Concentração(ões) testada(s);

— Condições de armazenagem e de estabilidade, se conhecidas;

— Referência ao historial dos resultados dos controlos positivos que demonstrem o cumprimento dos critérios de aceitação da execução, se aplicável.

Controlo negativo e controlo do solvente/veículo

— Identificação química, como o(s) nome(s) IUPAC ou CAS, o(s) número(s) CAS, o código SMILES ou InChI, a fórmula estrutural e/ou outros identificadores;

— Grau de pureza, identidade química das impurezas, conforme adequado e exequível, etc.;

— Aspeto físico, massa molecular e outras propriedades físico-químicas pertinentes, caso seja utilizado um solvente/veículo diferente dos mencionados nas orientações de ensaio, na medida em que estejam disponíveis;

— Condições de armazenagem e de estabilidade, se conhecidas;

— Justificação da escolha do solvente/veículo para cada produto químico em estudo.

Condições de ensaio

— Nome e endereço do promotor, do laboratório e do diretor do estudo;

— Descrição do método de ensaio utilizado;

— Linha celular utilizada, respetivas condições de armazenamento e origem (por exemplo, instalação de onde provêm as células);

— Citometria de fluxo utilizada (por exemplo, modelo), incluindo parâmetros dos instrumentos, anticorpos e marcador de citotoxicidade utilizados;

— Procedimento utilizado para demonstrar as competências do laboratório na realização do ensaio, mediante o teste de substâncias para demonstração de competência, e procedimento utilizado para demonstrar a reprodutibilidade do desempenho do ensaio ao longo do tempo, por exemplo dados históricos do controlo e/ou dados históricos dos controlos de reatividade.

Critérios de aceitação do ensaio

— Viabilidade celular e valores IE CD86 obtidos com o controlo do solvente/veículo, em comparação com os intervalos de aceitação;

▼M8

— Viabilidade celular e valores IE obtidos com o controlo positivo, em comparação com os intervalos de aceitação;

— Viabilidade celular de todas as concentrações testadas do produto químico em estudo.

Procedimento de ensaio

— Número de execuções realizadas;

— Concentrações do produto químico em estudo, aplicação e tempo de exposição utilizado (se diferente do recomendado);

— Duração da exposição,

— Descrição dos critérios de avaliação e de decisão utilizados;

— Descrição de eventuais modificações do procedimento de ensaio.

Resultados

— Quadro com os dados, incluindo o valor CV70 (se pertinente), IE, valores de viabilidade celular, valores CE150 (se pertinente) obtidos para o produto químico em estudo e para o controlo positivo em cada execução, bem como uma indicação da classificação do produto químico em estudo segundo o modelo preditivo;

— Descrição de quaisquer outras observações pertinentes, se for caso disso.

Discussão dos resultados

— Discussão dos resultados obtidos com o método U-SENS™;

— Análise dos resultados do ensaio no contexto de uma IATA, caso se disponha de outras informações pertinentes.

Conclusões

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(1) Piroird, C., Ovigne, J.M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* 29, 901-916.

(2) EURL ECVAM (2017). The U-SENS™ test method Validation Study Report. Disponível em: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/ /eurl-ecvam-recommendations

(3) EC EURL ECVAM (2016). ESAC Opinion No 2016-03 on the L'Oréal-coordinated study on the transferability and reliability of the U-SENS™ test method for skin sensitisation testing. EUR 28 178 EN; doi 10.2 787/8157 37. Disponível em: [http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103705].

(4) EC EURL ECVAM (2017). EURL ECVAM Recommendation on the use of non-animal approaches for skin sensitisation testing. EUR 28 553 EN; doi 10.2 760/5889 55. Disponível em: https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/eur-scientific-and-technical-research-reports/eurl-ecvam-recommendation-use-non-animal-approaches-skin-sensitisation-testing.

(5) Steiling, W. (2016). Safety Evaluation of Cosmetic Ingredients Regarding their Skin Sensitization Potential. doi:10.3390/cosmetics3020014.*Cosmetics* 3, 14.

▼**M8**

(6) OECD (2016). Guidance Document on The Reporting of Defined Approaches and Individual Information Sources to be Used Within Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Series on Testing & Assessment No 256, ENV/JM/MONO(2016)29. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Disponível em: [http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(7) Urbisch, D., Mehling, A., Guth, K., Ramirez, T., Honarvar, N., Kolle, S., Landsiedel, R., Jaworska, J., Kern, P.S., Gerberick, F., Natsch, A., Emter, R., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Sakaguchi, H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 71, 337-351.

(8) Alépée, N., Piroird, C., Aujoulat, M., Dreyfuss, S., Hoffmann, S., Hohenstein, A., Meloni, M., Nardelli, L., Gerbeix, C., Cotovio, J. (2015). Prospective multicentre study of the U-SENS test method for skin sensitization testing. *Toxicol In Vitro* 30, 373-382.

(9) Reisinger, K., Hoffmann, S., Alépée, N., Ashikaga, T., Barroso, J., Elcombe, C., Gellatly, N., Galbiati, V., Gibbs, S., Groux, H., Hibatallah, J., Keller, D., Kern, P., Klaric, M., Kolle, S., Kuehnl, J., Lambrechts, N., Lindstedt, M., Millet, M., Martinozzi-Teissier, S., Natsch, A., Petersohn, D., Pike, I., Sakaguchi, H., Schepky, A., Tailhardat, M., Templier, M., van Vliet, E., Maxwell, G. (2014). Systematic evaluation of non-animal test methods for skin sensitisation safety assessment. *Toxicol. In Vitro* 29, 259-270.

(10) Fabian, E., Vogel, D., Blatz, V., Ramirez, T., Kolle, S., Eltze, T., van Ravenzwaay, B., Oesch, F., Landsiedel, R. (2013). Xenobiotic metabolizin enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. *Arch. Toxicol.* 87, 1683-1696.

(11) OECD. (2018). Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Disponível em: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD Final Draft GIVIMP.pdf.

(12) DB-ALM (2016). Protocol no 183: Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS™), 33pp. Disponível em: [http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/].

(13) Sundström, C., Nilsson, K. (1976). Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int. J. Cancer* 17, 565-577.

(14) OECD (2005). Series on Testing and Assessment No. 34: Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Disponível em: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(15) United Nations UN (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, Sixth Revised Edition, Nova Iorque e Genebra: United Nations Publications. Disponível em: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.

(16) OECD (2012). Series on Testing and Assessment No 168: The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Disponível em: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(17) ECETOC (2003). Technical Report No 87: Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals, Bruxelas. Disponível em:https://ftp.cdc.gov/pub/Documents/OEL/06.%20Dotson/References/ECETOC_2003-TR87.pdf.

▼**M8**

Apêndice 2.1

DEFINIÇÕES

AOP (*Adverse Outcome Pathway* – via determinante dos efeitos nocivos): Sequência de eventos que parte da estrutura química de um produto químico alvo ou de um grupo de produtos químicos análogos, passa pelo evento molecular iniciador, e resulta num resultado com consequências *in vivo* (15).

CV70: Concentração estimada que apresenta uma viabilidade celular de 70 %.

Deriva: A deriva é definida pelo seguinte i) valor corrigido %$CD86^+$ do replicado 3 do controlo não tratado é inferior a 50 % da média corrigida do valor %$CD86^+$ dos replicados 1 e 2 do controlo não tratado; e ii) valor corrigido %$CD86^+$ do replicado 3 do controlo negativo é inferior a 50 % da média corrigida do valor %$CD86^+$ dos replicados 1 e 2 do controlo negativo.

CE150: Concentrações estimadas que apresentam um IE de 150 % para a expressão de CD86.

Citometria de fluxo: Técnica citométrica na qual células em suspensão num fluido passam, uma a uma, por um foco de excitação luminosa, disperso em padrões característicos das células e dos seus componentes; as células são frequentemente marcadas com marcadores fluorescentes, para que a luz seja primeiro absorvida e depois emitida a uma frequência diferente.

Controlo positivo: Replicado que contém todos os componentes de um sistema de ensaio e foi tratado com uma substância conhecida por induzir uma resposta positiva. Para que seja possível determinar a variabilidade no tempo da resposta do controlo positivo, a magnitude da resposta positiva não deve ser excessiva.

Controlo do solvente/veículo: Amostra não tratada que contém todos os componentes de um sistema de ensaio, com exceção do produto químico em estudo, mas incluindo o solvente/veículo utilizado. Serve para determinar a resposta de referência para as amostras tratadas com o produto químico em estudo dissolvido ou em dispersão estável no mesmo solvente/veículo. Quando testada simultaneamente com um controlo de meio, esta amostra também indica se o solvente/ /veículo interage com o sistema de ensaio.

Ensaio válido: Um ensaio considerado suficientemente pertinente e fiável para um fim específico e que se baseia em princípios cientificamente sólidos. Um ensaio nunca é válido em termos absolutos, mas apenas em relação a um objetivo definido (14).

Especificidade: Proporção dos produtos químicos negativos/inativos que são corretamente classificados pelo ensaio. Permite medir a precisão de um ensaio que produz resultados categóricos e é um aspeto importante a ter em conta na avaliação da pertinência de um ensaio (14).

Execução: Consiste em testar um ou mais produtos químicos em estudo simultaneamente com um controlo do solvente/veículo e com um controlo positivo.

Fiabilidade: Indica em que medida um ensaio pode ser reproduzido ao longo do tempo num mesmo laboratório e entre laboratórios, utilizando o mesmo protocolo. Para a avaliar, calcula-se a reprodutibilidade intralaboratorial e interlaboratorial, bem como a repetibilidade intralaboratorial (14).

IATA (*Integrated Approach to Testing and Assessment* – abordagem integrada de ensaio e avaliação): Abordagem estruturada utilizada para a identificação (potencial) e caracterização (potência) do perigo e/ou para a avaliação da segurança (potencial/potência e exposição) de um produto químico ou grupo de produtos químicos, que integra e pondera, de forma estratégica, todos os dados pertinentes com o objetivo de ser tida em conta numa decisão regulamentar sobre o potencial perigo e/ou risco e/ou a necessidade de realizar ensaios complementares específicos.

IE: Índice de estimulação. Valores relativos da média geométrica da intensidade de fluorescência das células tratadas com o produto químico em comparação com as células tratadas com o solvente.

▼M8

Mistura: Uma mistura ou solução composta por duas ou mais substâncias.

Perigo: Propriedade intrínseca de um agente, ou de uma situação, suscetível de causar efeitos nocivos quando um organismo, sistema ou (sub)população é exposto ao agente em causa.

Pertinência: Descrição da relação do ensaio com o efeito em estudo e da adequação e utilidade do ensaio para um fim específico. Traduz a medida em que o ensaio mede ou prevê corretamente o efeito biológico em causa. A pertinência tem em conta a precisão (concordância) de um ensaio (14).

Precisão: Grau de acordo entre os resultados do ensaio e os valores de referência aceites. Trata-se de uma medida do desempenho do ensaio e de um dos aspetos da sua pertinência. Este termo e o termo «concordância» são muitas vezes utilizados indistintamente para indicar a proporção de resultados corretos de um ensaio (14).

Pré-haptenos: Produtos químicos que se tornam sensibilizantes por transformação abiótica, por exemplo por oxidação.

Pró-haptenos: Produtos químicos que requerem ativação enzimática para exercerem potencial de sensibilização cutânea.

Produto químico: Uma substância ou mistura.

Produto químico em estudo: Qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado o presente método.

Resposta de CD86 ligada à concentração: O efeito é dependente da concentração (ou resposta ligada à concentração) quando uma concentração positiva (IE CD86 $\geq$ 150) é seguida de uma concentração com um IE CD86 ainda maior.

Sensibilidade: Proporção de todos os produtos químicos positivos/ativos que são corretamente classificados pelo ensaio. Permite medir a precisão de um ensaio que produz resultados categóricos e é um aspeto importante a ter em conta na avaliação da pertinência de um ensaio (14).

Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos das Nações Unidas – GHS da ONU (em inglês: United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals – UN GHS) Sistema que propõe a classificação dos produtos químicos (substâncias e misturas) em função de tipos e níveis normalizados de perigos físicos, sanitários e ambientais e trata dos elementos de comunicação correspondentes, nomeadamente pictogramas, palavras-sinal, advertências de perigo, recomendações de prudência e fichas de dados de segurança, de modo a transmitir informações sobre os respetivos efeitos nocivos, tendo em vista a proteção das pessoas (incluindo empregadores, trabalhadores, transportadores, consumidores e pessoal dos serviços de emergência) e do ambiente (16).

Substância: Um elemento químico e seus compostos, no estado natural ou obtidos por qualquer processo de produção, incluindo qualquer aditivo necessário para preservar a sua estabilidade e quaisquer impurezas resultantes do processo utilizado, mas excluindo qualquer solvente que possa ser separado sem afetar a estabilidade da substância nem alterar a sua composição.

Substância monocomponente: Uma substância, definida pela sua composição quantitativa, da qual um dos principais componentes está presente num teor de, pelo menos, 80 % (m/m).

▼**M8**

Substância multicomponentes: Uma substância, definida pela sua composição quantitativa, da qual mais do que um dos principais componentes está presente numa concentração ≥ 10 % (m/m) e < 80 % (m/m). As substâncias multicomponentes resultam de processos de fabrico. A diferença entre uma mistura e uma substância multicomponentes é que a primeira se obtém misturando duas ou mais substâncias, sem reação química. As substâncias multicomponentes resultam de reações químicas.

Tampão de coloração: Uma solução salina de tampão fosfato com 5 % de soro fetal de vitelo.

UVCB: Substâncias de composição desconhecida ou variável, produtos de reação complexos ou materiais biológicos.

▼**M8**

Apêndice 2.2

SUBSTÂNCIAS PARA A DEMONSTRAÇÃO DE COMPETÊNCIA

Antes de utilizarem, por rotina, o ensaio descrito no presente apêndice do método de ensaio B.71, os laboratórios devem demonstrar a sua competência técnica obtendo corretamente a previsão esperada com o método U-SENS™ para as dez substâncias recomendadas no quadro 1 e obtendo valores CV70 e CE150 que se encontrem dentro do intervalo de referência correspondente para, pelo menos, oito das dez substâncias de demonstração de competência. Estas substâncias foram selecionadas de modo a representarem o conjunto de respostas possíveis no que diz respeito aos perigos de sensibilização cutânea. Outros critérios de seleção foram a disponibilidade comercial das substâncias e a disponibilidade de dados de referência *in vivo* de elevada qualidade, bem como de dados *in vitro* de alta qualidade produzidos com o método U-SENS™. Além disso, estão disponíveis dados de referência publicados para o método U-SENS™ (1) (8).

Quadro 1

Substâncias recomendadas para a demonstração de competência técnica com o método U-SENS™

Substâncias para a demonstração de competência	N.º CAS	Estado físico	Previsão *in vivo* (1)	U-SENS Solvente/ Veículo	U-SENS Intervalo de referência CV70 em µg/ml (2)	U-SENS Intervalo de referência CE150 em µg/ml (2)
4-Fenilenodiamina	106-50-3	Sólido	Sensibilizante (forte)	Meio completo (3)	< 30	Positivo (≤ 10)
Ácido picrilsulfónico	2508-19-2	Líquido	Sensibilizante (forte)	Meio completo	> 50	Positivo (≤ 50)
Maleato de dietilo	141-05-9	Líquido	Sensibilizante (moderado)	DMSO	10-100	Positivo (≤ 20)
Resorcinol	108-46-3	Sólido	Sensibilizante (moderado)	Meio completo	> 100	Positivo (≤ 50)
Álcool cinâmico	104-54-1	Sólido	Sensibilizante (fraco)	DMSO	> 100	Positivo (10-100)
4-Alilanisol	140-67-0	Líquido	Sensibilizante (fraco)	DMSO	> 100	Positivo (< 200)
Sacarina	81-07-2	Sólido	Não sensibilizante	DMSO	> 200	Negativo (> 200)
Glicerol	56-81-5	Líquido	Não sensibilizante	Meio completo	> 200	Negativo (> 200)
Ácido láctico	50-21-5	Líquido	Não sensibilizante	Meio completo	> 200	Negativo (> 200)
Ácido salicílico	69-72-7	Sólido	Não sensibilizante	DMSO	> 200	Negativo (> 200)

Abreviaturas: N.º CAS = Número de registo do Chemical Abstracts Service

(1) A previsão de perigo (e potência) *in vivo* baseia-se em dados LLNA (1) (8). A potência *in vivo* é determinada utilizando os critérios propostos pelo ECETOC (17).

(2) Com base em valores históricos observados (1) (8).

(3) Meio completo: meio RPMI-1640 complementado com 10 % de soro fetal de vitelo, 2 mM de L-glutamina, 100 unidades/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina (8).

▼M8

Apêndice 3

SENSIBILIZAÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO*: ENSAIO IL-8 LUC

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES

1. Ao contrário dos ensaios que visam analisar o nível de expressão de marcadores de superfície celular, o ensaio IL-8 Luc permite quantificar as variações da expressão da IL-8, uma citocina associada à ativação das células dendríticas. Na linha celular repórter IL-8 derivada da linha celular THP-1 (THP-G8, estabelecida a partir da linha celular da leucemia monocítica aguda humana THP-1), a expressão da IL-8 é medida após exposição a sensibilizantes (1). O nível de expressão da luciferase é, depois, utilizado para ajudar a distinguir os sensibilizantes dos não sensibilizantes cutâneos.

2. O ensaio IL-8 Luc foi objeto de um estudo de validação (2) realizado pelo Centro Japonês para a Validação de Métodos Alternativos (JaCVAM), pelo **Ministério da Economia, do Comércio e da Indústria** (METI) e pela Sociedade Japonesa **para Alternativas à Experimentação em Animais (JSAAE**), seguido de uma análise independente pelos pares (3) sob os auspícios do JaCVAM e do Ministério da Saúde, do Trabalho e da Segurança Social (MHLW), com o apoio da **Cooperação Internacional em matéria de Métodos de Ensaio** Alternativos (ICATM — International Cooperation on Alternative Test Methods). Tendo em conta todos os dados disponíveis e os contributos das entidades reguladoras e das partes interessadas, o ensaio IL-8 Luc é considerado útil no âmbito de uma IATA para distinguir os sensibilizantes dos não sensibilizantes, para efeitos de classificação e rotulagem de perigos. As referências bibliográficas contêm exemplos da utilização de dados do ensaio IL-8 Luc combinados com outras informações (4) (5) (6).

3. O ensaio IL-8 Luc demonstrou ser transferível para laboratórios experientes em cultura celular e na medição da luciferase. O nível de reprodutibilidade intralaboratorial e interlaboratorial foi de 87,7 % e 87,5 %, respetivamente. Os dados obtidos com o estudo de validação (2) e outros estudos publicados (1) (6) demonstram que, em comparação com o método LLNA, o ensaio IL-8 Luc permitiu efetuar uma previsão positiva ou negativa para 118 de 143 produtos químicos, produziu resultados inconclusivos para 25 produtos químicos e apresenta uma precisão de 86 % (101/118), uma sensibilidade de 96 % (92/96) e uma especificidade de 41 % (9/22) para a distinção entre os produtos químicos sensibilizantes cutâneos (categoria 1 do GHS da ONU/ /CLP) e não sensibilizantes (sem categoria, de acordo com o GHS da ONU/ /CLP). Excluindo as substâncias que não são abrangidas pelo âmbito de aplicação descrito *infra* (ponto 5), o ensaio IL-8 Luc permitiu classificar 113 de 136 produtos químicos como positivos ou negativos e 23 produtos químicos como inconclusivos. A precisão do ensaio IL-8 Luc é de 89 % (101/113), com uma sensibilidade de 96 % (92/96) e uma especificidade de 53 % (9/17). Utilizando os dados humanos citados em Urbisch *et al*. (7), o ensaio IL-8 Luc permitiu classificar 76 de 90 produtos químicos como positivos ou negativos e 14 produtos químicos como inconclusivos, com uma precisão de 80 % (61/76), uma sensibilidade de 93 % (54/58) e uma especificidade de 39 % (7/18). Excluindo as substâncias que não são abrangidas pelo seu âmbito de aplicação, o ensaio IL-8 Luc permitiu classificar 71 de 84 produtos químicos como positivos ou negativos e 13 produtos químicos como inconclusivos, com uma precisão de 86 % (61/71), uma sensibilidade de 93 % (54/58) e uma especificidade de 54 % (7/13). É mais provável que ocorram falsos negativos nas previsões efetuadas com o ensaio IL-8 Luc com produtos químicos com potencial de sensibilização cutânea baixo/moderado (subcategoria 1B do GHS da ONU/CLP) do que com produtos químicos com um potencial elevado (subcategoria 1A do GHS da ONU/CLP) (6). No seu conjunto, estas informações corroboram o papel do ensaio do IL-8 Luc na identificação dos perigos de sensibilização cutânea. Os valores relativos à precisão do método de ensaio IL-8 Luc utilizado isoladamente servem apenas de orientação, uma vez que o presente método

▼M8

deve ser combinado com outras fontes de informação no contexto de uma IATA e em conformidade com o disposto nos pontos 7 e 8 da Introdução Geral. Além disso, na avaliação de métodos de estudo da sensibilização cutânea que não utilizem animais, deve ter-se em mente que o método LLNA e outros ensaios com animais podem não refletir de forma adequada a situação no ser humano.

4. Os dados atualmente disponíveis demonstram que o ensaio IL-8 Luc é aplicável a produtos químicos em estudo que abrangem uma grande diversidade de grupos funcionais orgânicos, mecanismos de reação, potências de sensibilização cutânea (determinadas em estudos *in vivo*) e propriedades físico-químicas (2) (6).

5. Embora utilize o solvente X-VIVO^{TM} 15, o ensaio IL-8 Luc permite avaliar corretamente os produtos químicos com log P > 3,5 e os produtos químicos com uma solubilidade na água de cerca de 100 μg/ml, tal como calculado com o programa EPI Suite$_{TM}$. Além disso, o seu desempenho para detetar sensibilizantes com fraca solubilidade na água é superior ao do ensaio IL-8 Luc utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) como solvente (2). No entanto, os resultados negativos obtidos com produtos químicos em estudo não dissolvidos a 20 mg/ml podem ser falsos negativos, devido à sua incapacidade para se dissolverem no X-VIVO^{TM} 15. Por conseguinte, para estes produtos químicos, os resultados negativos não devem ser tidos em conta. No estudo de validação, observou-se uma elevada taxa de falsos negativos para os anidridos. Além disso, devido à capacidade metabólica limitada da linha celular utilizada (8) e às condições experimentais, os pró-haptenos (substâncias que requerem ativação metabólica) e os pré-haptenos (substâncias ativadas por oxidação) podem produzir resultados negativos no ensaio. No entanto, embora os resultados negativos obtidos com potenciais pré-haptenos ou pró-haptenos devam ser interpretados com prudência, o método IL-8 Luc permitiu identificar corretamente 11 de 11 pré-haptenos, 6/6 pró--haptenos e 6/8, pré-/pró-haptenos, no conjunto de dados do ensaio IL-8 Luc (2). O exame completo recentemente efetuado de três métodos de ensaio sem experimentação animal (o DPRA, o KeratinoSens™ e o h-CLAT) para detetar pré-haptenos e pró-haptenos (9) e o facto de as células THP-G8 utilizadas no ensaio IL-8 Luc serem uma linha celular derivada da THP-1, utilizada no método h-CLAT, permitem concluir que o ensaio IL-8 Luc, combinado com outros métodos, pode contribuir igualmente para melhorar a sensibilidade dos métodos sem recurso a animais na deteção de pré-haptenos e pró-haptenos. Os tensioativos testados até à data deram resultados positivos falsos, independentemente da sua tipologia (catiónicos, aniónicos ou não iónicos). Por último, os produtos químicos que interferem com a luciferase podem alterar a sua atividade/medição, provocando uma inibição aparente ou um aumento da luminescência (10). Por exemplo, foi notificado que concentrações de fitoestrogénios superiores a 1 μM interferem com sinais de luminescência noutros ensaios por gene repórter da luciferase, devido à sobreativação do gene repórter da luciferase. Por conseguinte, a expressão da luciferase obtida na presença de concentrações elevadas de fitoestrogénios ou de compostos suspeitos de ativar o gene repórter da luciferase de modo similar deve ser examinada com prudência (11). Atendendo ao que precede, os tensioativos, os anidridos e os produtos químicos que interferem com a luciferase são excluídos do âmbito de aplicação do presente ensaio. Nos casos em que seja demonstrado que o ensaio IL-8 Luc não é aplicável a outras categorias específicas de produtos químicos em estudo, este ensaio não deve ser utilizado para essas categorias específicas.

6. Tal como descrito acima, o ensaio IL-8 Luc ajuda a distinguir os sensibilizantes cutâneos dos não sensibilizantes. É necessário prosseguir os trabalhos, de preferência com base em dados humanos, para determinar se os resultados do IL-8 Luc poderão contribuir para a avaliação do potencial de sensibilização cutânea quando considerados em combinação com outras fontes de informação.

▼M8

7. São apresentadas definições no apêndice 3.1.

PRINCÍPIO DO ENSAIO

8. O método de ensaio IL-8 Luc utiliza uma linha celular da leucemia monocítica humana, THP-1, obtida junto da American Type Culture Collection (Manassas, VA, EUA). A partir desta linha celular, o Departamento de Dermatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Tohoku desenvolveu a linha celular repórter IL-8, derivada da THP-1, a THP-G8, que contém os genes da luciferase laranja (Stable Luciferase Orange, SLO) e vermelha (Stable Luciferase Red, SLR), sob o controlo dos promotores da IL-8 e da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), respetivamente (1). Este sistema permite quantificar a indução do gene da luciferase por deteção da luminescência produzida por substratos de luciferase conhecidos pela sua emissão luminosa como indicador da atividade da IL-8 e da GAPDH nas células após a exposição a produtos químicos sensibilizantes.

9. O sistema de ensaio bicolor inclui uma luciferase emissora de laranja (SLO; λmáx. = 580 nm) (12) para a expressão genética do promotor da IL-8, bem como uma luciferase emissora de vermelho (SLR; λmáx. = 630 nm) (13) para a expressão genética do promotor do controlo interno, GAPDH. As duas luciferases emitem cores diferentes quando reagem à d-luciferina de pirilampo e a sua luminescência é medida simultaneamente aquando de uma reação numa só etapa, dividindo a emissão proveniente da mistura do ensaio com o auxílio de um filtro ótico (14) (apêndice 3.2).

10. As células THP-G8 são tratadas durante 16 horas com o produto químico em estudo, após o que a atividade da luciferase SLO (SLO-LA), indicativa da atividade do promotor da IL-8, e da luciferase SLR (SLR-LA), indicativa da atividade do promotor da GAPDH, são medidas. Para facilitar a compreensão das abreviaturas, SLO-LA e SLR-LA são designadas, respetivamente, por IL8LA e GAPLA. O quadro 1 apresenta uma descrição dos termos associados à atividade da luciferase no ensaio IL-8 Luc. Os valores medidos são utilizados para calcular a IL8LA normalizado (nIL8LA), ou seja, o rácio IL8LA/GAPLA; a indução da nIL8LA (Ind-IL8LA), que é o rácio entre a média aritmética dos quatro valores medidos da nIL8LA das células THP-G8 tratadas com o produto químico em estudo e os valores da nIL8LA das células THP-G8 não tratadas; e a inibição da GAPLA (Inh-GAPLA), que é o rácio entre a média aritmética dos quatro valores medidos da GAPLA das células THP-G8 tratadas com um produto químico em estudo e os valores da GAPLA das células THP-G8 não tratadas, e é utilizada como indicador de citotoxicidade.

Quadro 1

Descrição dos termos associados à atividade da luciferase no ensaio IL-8 Luc

Abreviaturas	Definição
GAPLA	Atividade da luciferase SLR indicativa da atividade do promotor da GAPDH
IL8LA	Atividade da luciferase SLO indicativa da atividade do promotor da IL-8
nIL8LA	IL8LA/GAPLA
Ind-IL8LA	nIL8LA das células THP-G8 tratadas com produtos químicos/nIL8LA das células não tratadas

▼M8

Abreviaturas	Definição
Inh-GAPLA	GAPLA das células THP-G8 tratadas com produtos químicos/GAPLA das células não tratadas
CV05	A concentração mais baixa do produto químico à qual a Inh-GAPLA passa a ser < 0,05.

11. Estão disponíveis normas de desempenho (15) que permitem facilitar a validação de métodos de ensaio *in vitro* modificados utilizando ensaios IL-8 da luciferase semelhantes ao ensaio IL-8 Luc, bem como modificar rapidamente as orientações de ensaio 442E da OCDE para que passem a incluir os referidos métodos. A aceitação mútua de dados (AMD) da OCDE só será garantida para métodos de ensaio validados de acordo com as normas de desempenho, se esses métodos tiverem sido examinados e incluídos nas orientações de ensaio 442E pela OCDE (16).

DEMONSTRAÇÃO DE COMPETÊNCIA

12. Antes de utilizarem, por rotina, o ensaio descrito no presente apêndice do método de ensaio B.71, os laboratórios devem demonstrar a sua competência técnica utilizando as dez substâncias enumeradas no apêndice 3.3, em conformidade com as boas práticas para os métodos *in vitro* (17). Além disso, os utilizadores do ensaio devem conservar uma base de dados históricos resultantes dos controlos de reatividade (ver ponto 15), obtidos com o controlo positivo e com o controlo do solvente/veículo (ver pontos 21 a 24), e utilizar esses dados para confirmar que a reprodutibilidade do método de ensaio no seu laboratório se mantém ao longo do tempo.

PROCEDIMENTO

13. O procedimento operacional normalizado (PON) para o ensaio IL-8 Luc está disponível e deve ser utilizado para a realização do ensaio (18). Os laboratórios que desejem aplicar este ensaio podem obter a linha celular recombinante THP-G8 junto do laboratório GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japão, após a assinatura de um acordo de transferência de material, em conformidade com as condições enunciadas no modelo de acordo da OCDE. Os pontos que se seguem apresentam uma descrição dos principais elementos e procedimentos do ensaio.

Preparação das células

14. Convém utilizar a linha celular THP-G8 do laboratório GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japão, para realizar o ensaio IL-8 Luc (ver pontos 8 e 13). Após a receção, as células são propagadas (2-4 passagens) e armazenadas congeladas, como uma reserva homogénea. As células desta reserva podem ser propagadas até um máximo de 12 passagens ou um máximo de seis semanas. O meio utilizado para a propagação é o meio de cultura RPMI-1640 com 10 % de soro bovino fetal (SBF), uma solução antibiótica/antimicótica (100 U/ml de penicilina G, 100 µg/ml de estreptomicina e 0,25 µg/ml de anfotericina B numa solução salina a 0,85 %) (por exemplo, GIBCO Cat#15240-062), 0,15 µg/ml de puromicina (por exemplo, n.º CAS 58-58-2) e 300 µg/ml de G418 (por exemplo, n.º CAS 108321-42-2).

15. Antes da utilização para o ensaio, as células devem ser qualificadas através de um controlo de reatividade. Esta verificação deve ser efetuada uma a duas semanas ou duas a quatro passagens após descongelação, utilizando como controlo positivo o brometo de 4-nitrobenzilo (4-NBB) (n.º CAS: 100-11-8, pureza ≥ 99 %) e como controlo negativo o ácido láctico (AL) (n.º CAS: 50-21-5, pureza ≥ 85 %). O 4-NBB deve produzir uma resposta positiva para Ind-IL8LA (≥ 1,4), ao passo que o ácido láctico deve produzir uma resposta negativa para Ind-IL8LA (< 1,4). Apenas são utilizadas para o ensaio células que tenham passado o controlo de reatividade. O controlo de reatividade deve ser efetuado de acordo com os procedimentos descritos nos pontos 22 a 24.

▼M8

16. Para o ensaio, as células THP-G8 são inoculadas a uma densidade de 2 a 5 × 10^5 células/ml e pré-cultivadas em frascos de cultura durante 48 a 96 horas. No dia do ensaio, as células colhidas do frasco de cultura são lavadas com RPMI-1640 contendo 10 % de SBF sem antibióticos e, em seguida, colocadas novamente em suspensão com RPMI-1640 contendo 10 % de SBF sem antibióticos a 1 × 10^6 células/ml. Em seguida, as células são distribuídas por uma placa negra de 96 poços de fundo plano (por exemplo, Costar Cat#3603) com 50 µl (5 × 10^4 de células/poço).

Preparação do produto químico em estudo e das substâncias de controlo

17. O produto químico em estudo e as substâncias de controlo são preparados no dia do ensaio. Para o ensaio IL-8 Luc, os produtos químicos em estudo são dissolvidos em X-VIVO™ 15, um meio isento de soro comercialmente disponível (Lonza, 04-418Q), até atingir uma concentração final de 20 mg/ml. O meio X-VIVO™ 15 é adicionado, num tubo de microcentrífuga, a 20 mg de produto químico em estudo (independentemente da solubilidade deste), até atingir um volume de 1 ml e, em seguida, é misturado vigorosamente num vórtex e agitado num rotor a uma velocidade máxima de 8 rpm durante 30 minutos a uma temperatura ambiente de cerca de 20 °C. Além disso, se os produtos químicos sólidos continuarem por dissolver, o tubo é sonicado até à dissolução completa do produto químico ou até à obtenção de uma dispersão estável. No caso de produtos químicos solúveis em X-VIVO™ 15, a solução é diluída por um fator de 5 no X-VIVO™ 15 e utilizada como solução-mãe do produto químico em estudo no X-VIVO™ 15 (4 mg/ml). No caso de produtos químicos não solúveis em X-VIVO™ 15, a mistura é novamente misturada por rotação durante pelo menos 30 minutos, e depois centrifugada a 15000 rpm (≈20000*g*) durante 5 minutos; o sobrenadante é utilizado como solução-mãe do produto químico em estudo no X-VIVO™ 15. Caso sejam utilizados outros solventes, como DMSO, água ou o meio de cultura, a escolha deve ser fundamentada cientificamente. O procedimento pormenorizado para a dissolução dos produtos químicos é descrito no apêndice 3.5. As soluções X-VIVO™ 15 descritas nos pontos 18 a 23 são misturadas na proporção 1:1 (v/v) com as suspensões de células preparadas numa placa negra de 96 poços de fundo plano (ver ponto 16).

18. A primeira execução do ensaio destina-se a determinar a concentração citotóxica e a examinar o potencial de sensibilização cutânea dos produtos químicos. Utilizando o X-VIVO™ 15, são efetuadas diluições em série, de fator 2, das soluções-mãe dos produtos químicos em estudo no X-VIVO™ 15 (ver apêndice 3.5) utilizando um bloco de ensaio de 96 poços (por exemplo, Costar Cat#EW-01729-03). Em seguida, acrescentam-se 50 µl/poço de solução diluída a 50 µl das células em suspensão numa placa negra de 96 poços de fundo plano. Assim, no caso de produtos químicos solúveis em X-VIVO™ 15, as concentrações finais dos produtos químicos em estudo variam entre 0,002 e 2 mg/ml (apêndice 3.5). No caso dos produtos químicos em estudo que não são solúveis em X-VIVO™ 15 a 20 mg/ml, apenas são determinados fatores de diluição entre 2 e 2^{10}, apesar de as concentrações finais reais dos produtos químicos em estudo se manterem incertas e dependerem da concentração saturada dos produtos químicos em estudo na solução-mãe X-VIVO™ 15.

19. Nas execuções seguintes (isto é, o segundo, o terceiro e o quarto replicados), a solução-mãe X-VIVO™ 15 é preparada a uma concentração quatro vezes superior à concentração de viabilidade celular 05 (CV05; a concentração mais baixa à qual a Inh-GAPLA passa a ser < 0,05) observada na primeira experiência. Se a Inh-GAPLA não descer abaixo dos 0,05 à concentração mais elevada na primeira execução, a solução-mãe X-VIVO™ 15 é preparada à concentração mais elevada da primeira execução. A concentração CV05 é calculada dividindo a concentração da solução-mãe da primeira execução pelo fator de diluição de CV05 (X) (fator de diluição CV05 (X); o fator de diluição necessário para diluir a solução-mãe até alcançar o valor CV05) (ver apêndice 3.5). Para as substâncias em estudo não solúveis em X-VIVO a 20 mg/ml, o valor CV05 é determinado pela concentração da solução-mãe × 1/X. Para as execuções 2 a 4, prepara-se uma segunda solução-mãe a uma concentração de 4 × CV05 (apêndice 3.5).

▼**M8**

20. Efetuam-se diluições em série das segundas soluções-mãe do X-VIVO™ 15 por um fator de 1,5 utilizando um bloco de ensaio de 96 poços. Em seguida, acrescentam-se 50 µl/poço de solução diluída a 50 µl da suspensão de células nos poços de uma placa negra de 96 poços de fundo plano. Cada concentração de cada produto químico em estudo deve ser testada em 4 poços. As amostras são, em seguida, misturadas num agitador de placas e incubadas durante 16 horas a 37 °C e 5 % CO_2, após o que a atividade da luciferase é determinada, como se descreve em seguida.

21. O controlo do solvente é a mistura de 50 µl/poço de X-VIVO™ 15 e de 50 µl/poço da suspensão de células no RPMI-1640 contendo 10 % de SBF.

22. O controlo positivo recomendado é o 4-NBB. A 20 mg de 4-NBB preparados num tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, é acrescentado X-VIVO™ 15 até atingir 1 ml. O tubo é misturado num vórtex vigorosamente e agitado num rotor a uma velocidade máxima de 8 rpm durante, pelo menos, 30 minutos. Após centrifugação a 20000 g durante 5 minutos, o sobrenadante é diluído por um fator de 4 no X-VIVO™ 15 e 500 µl do sobrenadante diluído são transferidos para um poço num bloco de ensaio de 96 poços. O sobrenadante diluído é novamente diluído em X-VIVO™ 15 por fatores de 2 e de 4 e, em seguida, são adicionados 50 µl da solução a 50 µl de suspensão de células THP-G8 nos poços de uma placa negra de 96 poços de fundo plano (apêndice 3.6). Cada concentração do controlo positivo deve ser testada em 4 poços. A placa é agitada num agitador de placas e incubada numa incubadora de CO_2 durante 16 horas (37 °C, 5 % CO^2), após o que a atividade da luciferase é medida, conforme descrito no ponto 29.

23. O controlo negativo recomendado é o ácido láctico. A 20 mg deste, preparado num tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, acrescenta-se X-VIVO™ 15 até atingir 1 ml (20 mg/ml). Diluem-se 20 mg/ml de solução de ácido láctico por um fator de 5 no X-VIVO™ 15 (4 mg/ml) e transferem-se 500 µl desta solução de ácido láctico a 4 mg/ml para um poço de um bloco de ensaio de 96 poços. Esta solução é diluída por um fator de 2 em X-VIVO™ 15 e, em seguida, diluída novamente por um fator de 2, de modo a obter soluções a 2 mg/ml e 1 mg/ml. Acrescentam-se 50 µl destas três soluções e de controlo do veículo (X-VIVO™ 15) a 50 µl de células THP-G8 em suspensão nos poços de uma placa negra de 96 poços de fundo plano. Cada concentração do controlo negativo é testada em 4 poços. A placa é agitada num agitador de placas e incubada numa incubadora de CO_2 durante 16 horas (37 °C, 5 % CO_2), após o que a atividade da luciferase é medida, conforme descrito no ponto 29.

24. Podem utilizar-se outros controlos positivos ou negativos adequados, se houver dados históricos que permitam definir critérios de aceitação comparáveis para a execução.

25. Deve ter-se o cuidado de evitar a evaporação de produtos químicos em estudo voláteis e a contaminação cruzada entre poços pelos produtos químicos em estudo, por exemplo selando a placa antes da incubação com os produtos químicos em estudo.

26. Os produtos químicos em estudo e o controlo do solvente exigem 2 a 4 execuções para derivar uma previsão positiva ou negativa (ver quadro 2). Cada execução é efetuada num dia diferente, com uma solução-mãe dos produtos químicos em estudo no X-VIVO™ 15 fresca e células colhidas separadamente. As células podem ser provenientes da mesma passagem.

▼M8

Medições da atividade da luciferase

27. A luminescência é medida utilizando um luminómetro para microplacas de 96 poços equipado com filtros óticos, por exemplo das séries Phelios (AT-TO, Tóquio, Japão), Tristan 941 (Berthold, Bad Wildbad, Alemanha) ou ARVO (PerkinElmer, Waltham, MA, EUA). Para garantir a reprodutibilidade, o luminómetro deve ser calibrado para cada ensaio (19). Estão disponíveis para esta calibração luciferases recombinantes de cor de laranja e vermelha.

28. Transfere-se 100 µl de reagente pré-aquecido Tripluc® Luciferase (Tripluc) para cada poço da placa que contém a suspensão de células tratadas, com ou sem produto químico. A placa é agitada durante 10 minutos a uma temperatura ambiente de cerca de 20 °C antes de ser colocada no luminómetro para medir a atividade da luciferase. A bioluminescência é medida durante três segundos sem filtro ótico (F0) e, em seguida, durante três segundos com filtro ótico (F1). Deve justificar-se o recurso a parâmetros alternativos, por exemplo em função do modelo de luminómetro utilizado.

29. Para cada concentração, os parâmetros são calculados a partir dos valores medidos, por exemplo IL8LA, GAPLA, nIL8LA, Ind-IL8LA, Inh-GAPLA, a média ± desvio padrão (DP) da IL8LA, a média ± DP da GAPLA, a média ± DP da nIL8LA, a média ± DP da Ind-IL8LA, a média ± DP da Inh-GAPLA e o intervalo de confiança de 95 % da Ind-IL8LA. As definições dos parâmetros utilizados no presente ponto são fornecidas nos apêndices 3.1 e 3.4, respetivamente.

30. Antes de proceder à medição num ensaio de repórter multicolor, convém realizar uma discriminação das cores, geralmente com o auxílio de detetores (luminómetro e leitor de placas) equipados com filtros óticos, tais como filtros de rejeição de banda (passa-alta ou passa-baixa) ou filtros passa-banda. Os coeficientes de transmissão dos filtros para cada cor do sinal de bioluminescência devem ser calibrados antes do ensaio, em conformidade com o apêndice 3.2.

DADOS E RELATÓRIOS

Avaliação dos dados

31. Os critérios a respeitar em cada execução para obter uma decisão positiva/ /negativa são os seguintes:

— uma previsão com o ensaio IL-8 Luc é considerada positiva se o produto químico em estudo apresentar um valor Ind-IL8LA ≥ 1,4 e se o limite inferior do intervalo de confiança de 95 % para Ind-IL8LA for ≥ 1,0;

— uma previsão com o ensaio IL-8 Luc é considerada negativa se o produto químico em estudo apresentar um valor Ind-IL8LA < 1,4 e/ou se o limite inferior do intervalo de confiança de 95 % para Ind-IL8LA for < 1,0.

Modelo preditivo

32. Os produtos químicos em estudo que apresentam dois resultados positivos entre a primeira, a segunda, a terceira ou a quarta execuções são considerados positivos, ao passo que os que apresentam três resultados negativos entre a primeira, a segunda, a terceira ou a quarta execuções são considerados potencialmente negativos (quadro 2). Entre os produtos químicos potencialmente negativos, os produtos químicos dissolvidos a 20 mg/ml no X-VIVO™ 15 são considerados negativos, ao passo que os produtos químicos não dissolvidos a 20 mg/ml de X-VIVO™ 15 não devem ser tidos em conta (figura 1).

▼M8

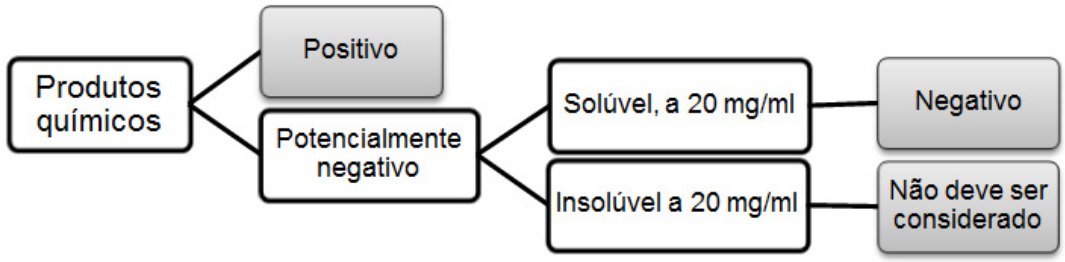
Quadro 2

Critérios de identificação dos produtos positivos e potencialmente negativos

1.ª execução	2.ª execução	3.ª execução	4.ª execução	Previsão final
Positivo	Positivo	–	–	Positivo
	Negativo	Positivo	–	Positivo
		Negativo	Positivo	Positivo
			Negativo	Potencialmente negativo
Negativo	Positivo	Positivo	–	Positivo
		Negativo	Positivo	Positivo
			Negativo	Potencialmente negativo
	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
			Negativo	Potencialmente negativo
		Negativo	–	Potencialmente negativo

Figura 1

Modelo preditivo para a decisão final



Critérios de aceitação

33. Ao utilizar o método de ensaio IL-8 Luc, devem respeitar-se os critérios de aceitação a seguir indicados:

— O valor Ind-IL8LA deve ser superior a 5,0, pelo menos, a uma concentração do controlo positivo, 4-NBB, em cada execução.

— O valor Ind-IL8LA deve ser inferior a 1,4 a qualquer concentração do controlo negativo (ácido láctico), em cada execução.

— Os dados resultantes de placas para as quais o valor GAPLA dos poços de controlo com células e Tripluc mas sem produtos químicos seja inferior a 5 vezes o valor dos poços que contêm apenas o meio de ensaio (50 µl/poço de RPMI-1640 contendo 10 % de SBF e 50 µl/poço de X-VIVO^{TM} 15) não devem ser tidos em conta.

— Os dados resultantes de placas para as quais o valor Inh-GAPLA a todas as concentrações dos produtos químicos em estudo ou de controlo seja inferior a 0,05 não devem ser tidos em conta. Neste caso, a primeira execução deve ser repetida, de modo a que a concentração final mais elevada no ensaio replicado seja a concentração final mais baixa da execução anterior.

▼M8

Relatório de ensaio

34. O relatório de ensaio deve conter as seguintes informações:

Produtos químicos em estudo

Substância monocomponente:

— Identificação química, como o(s) nome(s) IUPAC ou CAS, o(s) número(s) CAS, o código SMILES ou InChI, a fórmula estrutural e/ou outros identificadores;

— Aspeto físico, solubilidade na água, massa molecular e outras propriedades físico-químicas pertinentes, na medida em que estejam disponíveis;

— Grau de pureza, identidade química das impurezas, conforme adequado e exequível, etc.;

— Pré-tratamento, se for o caso (aquecimento ou moagem, por exemplo);

— Solubilidade em X-VIVO™ 15. No caso de produtos químicos insolúveis em X-VIVO™ 15, se se observa precipitação ou flotação após centrifugação;

— Concentração(ões) testada(s);

— Condições de armazenagem e de estabilidade, se conhecidas;

— Justificação da escolha do solvente/veículo para cada produto químico em estudo, se não tiver sido utilizado o X-VIVO™ 15.

Substância multicomponentes, UVCB e mistura:

— Caracterização, tanto quanto possível, por exemplo, por identidade química (ver *supra*), pureza, ocorrência quantitativa e propriedades físico-químicas relevantes (ver *supra*) dos componentes, na medida em que estejam disponíveis;

— Aspeto físico, solubilidade na água e outras propriedades físico-químicas relevantes, na medida em que estejam disponíveis;

— Massa molecular, ou massa molecular aparente no caso de misturas/polímeros de composições conhecidas, ou outras informações relevantes para a realização do estudo;

— Pré-tratamento, se for o caso (aquecimento ou moagem, por exemplo);

— Solubilidade em X-VIVO™ 15. No caso de produtos químicos insolúveis em X-VIVO™ 15, se se observa precipitação ou flotação após centrifugação;

— Concentração(ões) testada(s);

— Condições de armazenagem e de estabilidade, se conhecidas.

— Justificação da escolha do solvente/veículo para cada produto químico em estudo, se não tiver sido utilizado o X-VIVO™ 15.

Controlos

Controlo positivo:

— Identificação química, como o(s) nome(s) IUPAC ou CAS, o(s) número(s) CAS, o código SMILES ou InChI, a fórmula estrutural e/ou outros identificadores;

— Aspeto físico, solubilidade na água, massa molecular e outras propriedades físico-químicas, se conhecidas e se pertinente;

▼**M8**

— Grau de pureza, identidade química das impurezas, conforme adequado e exequível, etc.;

— Pré-tratamento, se for o caso (aquecimento ou moagem, por exemplo);

— Concentração(ões) testada(s);

— Condições de armazenagem e de estabilidade, se conhecidas;

— Referência a resultados históricos relativos ao controlo positivo que demonstrem a conformidade com os critérios de aceitação, se pertinente.

Controlo negativo:

— Identificação química, como o(s) nome(s) IUPAC ou CAS, o(s) número(s) CAS e/ou outros identificadores;

— Grau de pureza, identidade química das impurezas, conforme adequado e exequível, etc.;

— Aspeto físico, massa molecular e outras propriedades físico-químicas relevantes, se forem utilizados controlos negativos diferentes dos mencionados nas orientações de ensaio e na medida em que se encontrem disponíveis;

— Condições de armazenagem e de estabilidade, se conhecidas;

— Justificação da escolha do solvente, para cada produto químico em estudo.

Condições de ensaio

— Nome e endereço do promotor, do laboratório e do diretor do estudo;

— Descrição do método de ensaio utilizado;

— Linha celular utilizada, respetivas condições de armazenamento e origem (por exemplo, instalação de onde provêm as células);

— Número de lote e origem do SBF, nome do fornecedor, número de lote da placa negra de 96 poços de fundo plano e número de lote do reagente Tripluc;

— Número de passagens e densidade celular utilizadas para o ensaio;

— Método de contagem celular utilizado para a inoculação antes do ensaio e medidas tomadas para assegurar a homogeneidade da distribuição do número de células;

— Luminómetro utilizado (por exemplo, modelo), incluindo parâmetros dos instrumentos, substrato de luciferase utilizado e demonstração da adequação das medições de luminescência com base no ensaio de controlo descrito no apêndice 3.2;

— Procedimento utilizado para demonstrar a competência do laboratório para a realização do ensaio (por exemplo, através testando as substâncias para a demonstração de competência) ou para demonstrar a reprodutibilidade do desempenho do ensaio ao longo do tempo.

Procedimento de ensaio

— Número de replicados e de execuções efetuadas;

— Concentrações do produto químico em estudo, procedimento de aplicação e tempo de exposição (se forem diferentes dos recomendados);

▼**M8**

— Descrição dos critérios de avaliação e de decisão utilizados;

— Descrição dos critérios de aceitação do estudo utilizados;

— Descrição de eventuais modificações do procedimento de ensaio.

Resultados

— Medições de IL8LA e GAPLA;

— Cálculos para nIL8LA, Ind-IL8LA e Inh-GAPLA;

— O intervalo de confiança de 95 % de Ind-IL8LA;

— Gráfico ilustrativo das curvas dose-resposta para a indução da atividade da luciferase e a viabilidade;

— Descrição de quaisquer outras observações pertinentes, se for caso disso.

Discussão dos resultados

— Discussão dos resultados obtidos com o ensaio IL-8 Luc;

— Exame dos resultados do ensaio no contexto de uma IATA, caso estejam disponíveis outras informações pertinentes.

Conclusão

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(1) Takahashi T, Kimura Y, Saito R, Nakajima Y, Ohmiya Y, Yamasaki K, and Aiba S. (2011). An *in vitro* test to screen skin sensitizers using a stable THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8. Toxicol Sci 124:359-69.

(2) OECD (2017). Validation report for the international validation study on the IL-8 Luc assay as a test evaluating the skin sensitizing potential of chemicals conducted by the IL-8 Luc Assay. Series on Testing and Assessment No 267, ENV/JM/MONO(2017)19. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Disponível em: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications--number.htm.

(3) OECD (2017). Report of the Peer Review Panel for the IL-8 Luciferase (IL-8 Luc) Assay for *in vitro* skin sensitisation. Series on Testing and Assessment No 258, ENV/JM/MONO(2017)20. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Disponível em: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications--number.htm.

(4) OECD (2016) Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Series on Testing & Assessment No 256, ENV/JM/MONO(2016)29. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Disponível em: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series--testing-assessment-publications-number.htm.

(5) van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natsch A, van Loveren H, and Ezendam J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. Regul Toxicol Pharmacol 69:371-9.

(6) Kimura Y, Fujimura C, Ito Y, Takahashi T, Nakajima Y, Ohmiya Y, and Aiba S. (2015). Optimization of the IL-8 Luc assay as an *in vitro* test for skin sensitization. Toxicol *In Vitro* 29:1816-30.

▼**M8**

(7) Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, et al. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. Regul Toxicol Pharmacol 71:337-51.

(8) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N, and Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). Alternatives to laboratory animals: ATLA 38:275-84.

(9) Patlewicz G, Casati S, Basketter DA, Asturiol D, Roberts DW, Lepoittevin J-P, Worth A and Aschberger K (2016) Can currently available non-animal methods detect pre and pro haptens relevant for skin sensitisation? Regul Toxicol Pharmacol, 82:147-155.

(10) Thorne N, Inglese J, and Auld DS. (2010). Illuminating insights into firefly luciferase and other bioluminescent reporters used in chemical biology. Chem Biol 17:646-57.

(11) OECD (2016). Test No 455: Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists and Antagonists, OECD Publishing, Paris. http://dx.doi.org/10.1787/9789264265295-en.

(12) Viviani V, Uchida A, Suenaga N, Ryufuku M, and Ohmiya Y. (2001). Thr226 is a key residue for bioluminescence spectra determination in beetle luciferases. Biochem Biophys Res Commun 280:1286-91.

(13) Viviani VR, Bechara EJ, and Ohmiya Y. (1999). Cloning, sequence analysis, and expression of active Phrixothrix railroad-worms luciferases: relationship between bioluminescence spectra and primary structures. Biochemistry 38:8271-9.

(14) Nakajima Y, Kimura T, Sugata K, Enomoto T, Asakawa A, Kubota H, Ikeda M, and Ohmiya Y. (2005). Multicolor luciferase assay system: one-step monitoring of multiple gene expressions with a single substrate. Biotechniques 38:891-4.

(15) OECD (2017). A publicar - Performance Standards for the assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitisation IL-8 luc test methods. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. OECD, Paris, França

(16) OECD (2005). Guidance Document the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Environment, Health and Safety publications, OECD Series on Testing and Assessment No 34. OECD, Paris, França.

(17) OECD (2018). Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Disponível em: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD Final Draft GIVIMP.pdf.

(18) JaCVAM (2016). IL-8 Luc assay protocol. Disponível em: http://www.jacvam.jp/en_effort/effort02.html.

(19) Niwa K, Ichino Y, Kumata S, Nakajima Y, Hiraishi Y, Kato D, Viviani VR, and Ohmiya Y. (2010). Quantum yields and kinetics of the firefly bioluminescence reaction of beetle luciferases. Photochem Photobiol 86:1046-9.

▼**M8**

(20) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins, Part 1: Scientific Evidence. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No 168. OECD, Paris, França.

(21) United Nations (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Sixth revised edition. Nova Iorque e Genebra: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Disponível em: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

▼**M8**

Apêndice 3.1

DEFINIÇÕES

AOP (*Adverse Outcome Pathway* – via determinante dos efeitos nocivos): Sequência de eventos que parte da estrutura química de um produto químico alvo ou de um grupo de produtos químicos análogos, passa pelo evento molecular iniciador, e resulta num resultado com consequências *in vivo* (20).

Controlo positivo: Replicado que contém todos os componentes de um sistema de ensaio e foi tratado com uma substância conhecida por induzir uma resposta positiva. Para que seja possível determinar a variabilidade no tempo da resposta do controlo positivo, a magnitude da resposta positiva não deve ser excessiva.

Controlo do solvente/veículo: Amostra não tratada que contém todos os componentes de um sistema de ensaio, com exceção do produto químico em estudo, mas incluindo o solvente/veículo utilizado. Serve para determinar a resposta de referência para as amostras tratadas com o produto químico em estudo dissolvido ou em dispersão estável no mesmo solvente/veículo. Quando testada simultaneamente com um controlo de meio, esta amostra também indica se o solvente/ /veículo interage com o sistema de ensaio.

CV05: Viabilidade celular 05, ou seja, a concentração mínima à qual os produtos químicos produzem um valor Inh-GAPLA inferior a 0,05.

Especificidade: Proporção dos produtos químicos negativos/inativos que são corretamente classificados pelo ensaio. Permite medir a precisão de um ensaio que produz resultados categóricos e é um aspeto importante a ter em conta na avaliação da pertinência de um ensaio (16).

Execução: Consiste em testar um ou mais produtos químicos em estudo simultaneamente com um controlo do solvente/veículo e com um controlo positivo.

Fiabilidade: Indica em que medida um ensaio pode ser reproduzido ao longo do tempo num mesmo laboratório e entre laboratórios, utilizando o mesmo protocolo. Para a avaliar, calcula-se a reprodutibilidade intralaboratorial e interlaboratorial, bem como a repetibilidade intralaboratorial (16).

FInSLO-LA: Abreviatura utilizada no relatório de validação e em publicações anteriores relativas ao ensaio do IL-8 Luc para designar a Ind-IL8LA. Ver Ind-IL8LA para a definição.

GAPLA: Atividade da luciferase vermelha Stable Luciferase Red (SLR) (λmáx. = 630 nm), regulada pelo promotor da GAPDH e que demonstra a viabilidade celular e o número de células viáveis.

IATA (*Integrated Approach to Testing and Assessment – abordagem integrada de ensaio e avaliação)*: Abordagem estruturada utilizada para a identificação (potencial) e caracterização (potência) do perigo e/ou para a avaliação da segurança (potencial/potência e exposição) de um produto químico ou grupo de produtos químicos, que integra e pondera, de forma estratégica, todos os dados pertinentes com o objetivo de ser tida em conta numa decisão regulamentar sobre o potencial perigo e/ou risco e/ou a necessidade de realizar ensaios complementares específicos.

II-SLR-LA: Abreviatura utilizada no relatório de validação e em publicações anteriores relativas ao ensaio do IL-8 Luc para designar a Inh-GAPLA. Ver Inh-GAPLA para a definição.

IL-8 (interleucina-8): Uma citocina derivada de células endoteliais, fibroblastos, queratinócitos, macrófagos e monócitos que provoca a quimiotaxia dos neutrófilos e dos linfócitos T.

IL8LA: Atividade da luciferase laranja Stable Luciferase Orange (SLRO) (λmáx. = 580 nm), regulada pelo promotor da IL-8.

Ind-IL8LA: Variação de indução da nIL8LA. Obtém-se dividindo o valor nIL8LA das células THP-G8 tratadas com produtos químicos pelo valor das células THP-G8 não estimuladas; representa a indução da atividade do promotor da IL-8 por produtos químicos.

▼M8

Inh-GAPLA: Inibição da GAPLA. Obtém-se dividindo o valor GAPLA das células THP-G8 tratadas com produtos químicos pelo valor GAPLA das células THP-G8 não tratadas; representa a citotoxicidade dos produtos químicos.

Limiar mínimo de indução (LMI): A concentração mais baixa à qual um produto químico satisfaz os critérios de positividade.

Método de ensaio válido: Um ensaio considerado suficientemente pertinente e fiável para um fim específico e que se baseia em princípios cientificamente sólidos. Um ensaio nunca é válido em termos absolutos, mas apenas em relação a um objetivo definido.

Mistura: Uma mistura ou solução composta por duas ou mais substâncias.

nIL8LA: A atividade da SLO que reflete a atividade do promotor da IL-8 (IL8LA) normalizada pela atividade da SLR que reflete a atividade do promotor da GAPDH (GAPLA). Representa a atividade do promotor da IL-8 depois de considerar a viabilidade celular ou o número de células.

nSLO-LA: Abreviatura utilizada no relatório de validação e em publicações anteriores relativas ao ensaio do IL-8 Luc para designar a nIL8LA. Ver nIL8LA para a definição

Perigo: Propriedade intrínseca de um agente, ou de uma situação, suscetível de causar efeitos nocivos quando um organismo, sistema ou (sub)população é exposto ao agente em causa.

Pertinência: Descrição da relação do ensaio com o efeito em estudo e da adequação e utilidade do ensaio para um fim específico. Traduz a medida em que o ensaio mede ou prevê corretamente o efeito biológico em causa. A pertinência tem em conta a precisão (concordância) de um ensaio (16).

Precisão: Grau de acordo entre os resultados do ensaio e os valores de referência aceites. Trata-se de uma medida do desempenho do ensaio e de um dos aspetos da sua pertinência. Este termo e o termo «concordância» são muitas vezes utilizados indistintamente para indicar a proporção de resultados corretos de um ensaio (16).

Pré-haptenos: Produtos químicos que se tornam sensibilizantes por transformação abiótica.

Pró-haptenos: Produtos químicos que requerem ativação enzimática para exercerem potencial de sensibilização cutânea.

Produto químico: Uma substância ou mistura.

Produto químico em estudo: Qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado o presente método.

Sensibilidade: Proporção de todos os produtos químicos positivos/ativos que são corretamente classificados pelo ensaio. Permite medir a precisão de um ensaio que produz resultados categóricos e é um aspeto importante a ter em conta na avaliação da pertinência de um ensaio (16).

▼M8

Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos das Nações Unidas – GHS da ONU (em inglês: *United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals* – UN GHS): Sistema que propõe a classificação dos produtos químicos (substâncias e misturas) em função de tipos e níveis normalizados de perigos físicos, sanitários e ambientais e trata dos elementos de comunicação correspondentes, nomeadamente pictogramas, palavras-sinal, advertências de perigo, recomendações de prudência e fichas de dados de segurança, de modo a transmitir informações sobre os respetivos efeitos nocivos, tendo em vista a proteção das pessoas (incluindo empregadores, trabalhadores, transportadores, consumidores e pessoal dos serviços de emergência) e do ambiente (21).

SLO-LA: Abreviatura utilizada no relatório de validação e em publicações anteriores relativas ao ensaio do IL-8 Luc para designar a IL8LA. Ver IL8LA para a definição.

SLR-LA: Abreviatura utilizada no relatório de validação e em publicações anteriores relativas ao ensaio do IL-8 Luc para designar a GAPLA. Ver GAPLA para a definição.

Substância: Um elemento químico e seus compostos, no estado natural ou obtidos por qualquer processo de produção, incluindo qualquer aditivo necessário para preservar a sua estabilidade e quaisquer impurezas resultantes do processo utilizado, mas excluindo qualquer solvente que possa ser separado sem afetar a estabilidade da substância nem alterar a sua composição.

Substância monocomponente: Uma substância, definida pela sua composição quantitativa, da qual um dos principais componentes está presente num teor de, pelo menos, 80 % (m/m).

Substância multicomponentes: Uma substância, definida pela sua composição quantitativa, da qual mais do que um dos principais componentes está presente numa concentração $\geq$ 10 % (m/m) e $<$ 80 % (m/m). As substâncias multicomponentes resultam de processos de fabrico. A diferença entre uma mistura e uma substância multicomponentes é que a primeira se obtém misturando duas ou mais substâncias, sem reação química. As substâncias multicomponentes resultam de reações químicas.

Tensioativo: Também designado agente de superfície, é uma substância, como um detergente, capaz de reduzir a tensão superficial de um líquido, permitindo-lhe formar espuma ou penetrar em sólidos; é igualmente designado por agente molhante. (TG437)

THP-G8: Uma linha celular repórter da IL-8 utilizada no ensaio IL-8 Luc. A linha celular humana semelhante a macrófagos THP-1 foi transfetada com os genes da luciferase SLO e SLR sob o controlo dos promotores da IL-8 e da GAPDH, respetivamente.

UVCB: Substâncias de composição desconhecida ou variável, produtos de reação complexos ou materiais biológicos.

▼**M8**

Apêndice 3.2

PRINCÍPIO DE MEDIÇÃO DA ATIVIDADE DA LUCIFERASE E DETERMINAÇÃO DOS COEFICIENTES DE TRANSMISSÃO DE FILTRO ÓTICO PARA SLO E SLR

O sistema de ensaio multirrepórter – Tripluc – pode ser utilizado com luminómetro de microplacas equipado com um sistema de deteção multicolor com filtro ótico (por exemplo, Phelios AB-2350 (ATTO), ARVO (PerkinElmer), Tristar LB941 (Berthold)). O filtro ótico utilizado na medição é um filtro passa-alta ou passa-baixa de 600-620 nm ou um filtro passa-banda de 600-700 nm.

Medição de duas cores de luciferase com um filtro ótico

O exemplo seguinte utiliza o Phelios AB-2350 (ATTO). Este luminómetro está equipado com um filtro passa-alta de 600 nm (R60 HOYA Co., 600 nm LP, filtro 1) para separar a luminescência SLO (λmáx. = 580 nm) da luminescência SLR (λmáx. = 630 nm).

Para determinar os coeficientes de transmissão do filtro passa-alta de 600 nm, convém, em primeiro lugar, utilizando enzimas luciferases SLO e SLR purificadas: i) medir a intensidade da bioluminescência de SLO e SLR na ausência de filtro (F0), ii) medir a intensidade da bioluminescência de SLO e SLR que atravessou o filtro 1 (passa-alta 600 nm) e iii) calcular os coeficientes de transmissão do filtro 1 (600 nm) para SLO e SLR abaixo indicados.

Transmission coefficients		Abbreviation	Definition
SLO	Filter 1 Transmission coefficients	$=\kappa O_{R60}$	The filter's transmission coefficient for the SLO
SLR	Filter 1 Transmission coefficients	κR_{R60}	The filter's transmission coefficient for the SLR

Se a intensidade de SLO e SLR na amostra de ensaio for definida como O e R, respetivamente, i) a intensidade da luz sem filtro (todas as óticas) F0 e ii) a intensidade da luz transmitida através do filtro 1 (600 nm) F1 são descritas como se segue.

$F0 = O + R$

$F1 = \kappa O_{R60} \times O + \kappa R_{R60} \times R$

Estas equações podem ser reformuladas do seguinte modo:

$$\begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix}$$

Em seguida, utilizando os fatores de transmissão calculados (κO_{R60} e κR_{R60}) e os valores F0 e F1 medidos, é possível calcular os valores O e R do seguinte modo:

$$\begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix}^{-1} \begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix}$$

▼**M8**

Materiais e métodos para determinação do fator de transmissão

(1) *Reagentes*

Enzimas luciferases purificadas:

Enzima SLO purificada liofilizada

Enzima SLR purificada liofilizada

(que, para os trabalhos de validação, foram obtidas junto do GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japão com a linha celular THP-G8)

Reagente do ensaio:

Reagente Tripluc® Luciferase (por exemplo, de TOYOBO Cat#MRA-301)

Meio: para o ensaio da luciferase (30 ml, armazenada a 2-8 °C)

Reagente	Conc.	Conc. final no meio	Volume necessário
RPMI-1640	—	—	27 ml
SBF	—	10 %	3 ml

(2) *Preparação da solução enzimática*

Dissolver a enzima luciferase purificada liofilizada no tubo, adicionando 200 µl de 10 ~ 100 mM Tris/HCl ou Hepes/HCl (pH 7.5 ~ 8.0) e complementado com 10 % (m/v) de glicerol; dividir a solução enzimática em alíquotas de 10 µl em tubos descartáveis de 1,5 ml e armazená-los num congelador a -80 °C. A solução enzimática congelada pode ser utilizada no prazo de seis meses. Para utilizar as soluções, adicionar 1 ml de meio do ensaio da luciferase (RPMI-1640 com 10 % de SBF) a cada tubo de solução enzimática (solução enzimática diluída) e mantê-los em gelo, a fim de evitar a desativação.

(3) *Medição da bioluminescência*

Descongelar o reagente do ensaio Tripluc® Luciferase e mantê-lo à temperatura ambiente, quer em banho-maria, quer à temperatura do ar. Ligar o luminómetro 30 minutos antes do início da medição para permitir a estabilização do fotomultiplicador. Transferir 100 µl da solução enzimática diluída para uma placa negra de 96 poços (fundo plano) (amostra de referência SLO para #B1, #B2, #B3 e amostra de referência SLR para #D1, #D2, #D3). Em seguida, transferir 100 µl de Tripluc pré-aquecido para cada poço da placa que contém a solução enzimática diluída, utilizando uma pipeta automática. Agitar a placa durante 10 minutos à temperatura ambiente (cerca de 25 °C) num agitador de placas. Retirar as bolhas que se formarem nas soluções nos poços. Colocar a placa no luminómetro para medir a atividade da luciferase. A bioluminescência é medida durante três segundos sem filtro ótico (F0) e, em seguida, durante três segundos com filtro ótico (F1).

O coeficiente de transmissão do filtro ótico foi calculado do seguinte modo:

Coeficiente de transmissão (SLO (κO_{R60}))= (#B1 de F1+ #B2 de F1+ #B3 de F1) / (#B1 de F0+ #B2 de F0+ #B3 de F0)

▼**M8**

Coeficiente de transmissão (SLR (κR_{R60}))= (#D1 de F1+ #D2 de F1+ #D3 de F1) / (#D1 de F0+ #D2 de F0+ #D3 de F0)

Os fatores de transmissão calculados são utilizados para todas as medições executadas utilizando o mesmo luminómetro.

Controlo da qualidade do equipamento

Devem utilizar-se os procedimentos descritos no protocolo IL-8 Luc (18).

▼**M8**

Apêndice 3.3

SUBSTÂNCIAS PARA A DEMONSTRAÇÃO DE COMPETÊNCIA

Antes de utilizarem, por rotina, o ensaio descrito no presente apêndice do método de ensaio B.71, os laboratórios devem demonstrar a sua competência técnica obtendo a previsão esperada com o ensaio IL-8 Luc para as dez substâncias recomendadas no quadro 1 e obtendo valores que se encontrem dentro do intervalo de referência correspondente para, pelo menos, oito das dez substâncias de demonstração de competência (selecionadas para representar o intervalo de respostas possíveis ao perigo de sensibilização cutânea). Outros critérios de seleção foram a disponibilidade comercial das substâncias e a disponibilidade de dados de referência *in vivo* de elevada qualidade, bem como de dados *in vitro* de alta qualidade produzidos com o ensaio IL-8 Luc. Além disso, existem dados de referência publicados para o ensaio IL-8 Luc (6) (1).

Quadro 1

Substâncias recomendadas para a demonstração de competência técnica com o ensaio IL-8 Luc

Substâncias para a demonstração de competência	N.º CAS	Estado	Solubilidade em X-VIVO15 a 20 mg/ml	Previsão *in vivo* (1)	Previsão IL-8 Luc (2)	Intervalo de referência (μg/ml) (3)	
						CV_{05} (4)	MIT IL-8 Luc (5)
2,4-Dinitroclorobenzeno	97-00-7	Sólido	Insolúvel	Sensibilizante (extremo)	Positivo	2,3-3,9	0,5-2,3
Formaldeído	50-00-0	Líquido	Solúvel	Sensibilizante (forte)	Positivo	9-30	4-9
2-Mercaptobenzotiazol	149-30-4	Sólido	Insolúvel	Sensibilizante (moderado)	Positivo	250-290	60-250
Etilenodiamina	107-15-3	Líquido	Solúvel	Sensibilizante (moderado)	Positivo	500-700	0,1-0,4
Dimetacrilato de etilenoglicol	97-90-5	Líquido	Insolúvel	Sensibilizante (fraco)	Positivo	> 2000	0,04-0,1
4-Alilanisol (estragol)	140-67-0	Líquido	Insolúvel	Sensibilizante (fraco)	Positivo	> 2000	0,01-0,07
Sulfato de estreptomicina	3810-74-0	Sólido	Solúvel	Não sensibilizante	Negativo	> 2000	> 2000
Glicerol	56-81-5	Líquido	Solúvel	Não sensibilizante	Negativo	> 2000	> 2000
Isopropanol	67-63-0	Líquido	Solúvel	Não sensibilizante	Negativo	> 2000	> 2000

Abreviaturas: N.º CAS = Número de registo do Chemical Abstracts Service.
(1) A potência *in vivo* é determinada utilizando os critérios propostos pelo ECETOC (19).
(2) Com base em valores históricos observados (1) (6).
(3) Os valores CV_{05} e MIT IL-8 Luc foram calculados utilizando a solubilidade na água dada pelo programa EPI Suite™.
(4) CV_{05}: a concentração mínima à qual os produtos químicos apresentam uma Inh-GAPLA inferior a 0,05.
(5) MIT: as concentrações mais baixas às quais um produto químico satisfaz os critérios de positividade.

▼M8

Apêndice 3.4

ÍNDICES E CRITÉRIOS DE APRECIAÇÃO

nIL8LA (nSLO-LA)

A j-ésima repetição (j = 1 a 4) da i-ésima concentração (i = 0 a 11) é medida para IL8LA (SLO-LA) e GAPLA (SLR-LA), respetivamente. A IL8LA normalizada, designada por nIL8LA (nSLO-LA), é definida como:

$$nIL8LA_{ij} = IL8LA_{ij}/GAPLA_{ij}$$

Trata-se da unidade de medida de base neste ensaio.

Ind-IL8LA (FInSLO-LA)

O aumento médio do valor nIL8LA (nSLO-LA) para a repetição à i-ésima concentração em comparação com a mesma à concentração 0, Ind-IL8LA, é a medida principal deste ensaio. Esta relação é escrita através da fórmula seguinte:

$$\mathrm{Ind-IL8LA_i} = \left\{(1/4) \times \sum_{j} \mathrm{nIL8LA_{ij}}\right\} / \left\{(1/4) \times \sum_{j} \mathrm{nIL8LA_{0j}}\right\}$$

O laboratório principal propôs que um valor de 1,4 corresponda a um resultado positivo para o produto químico em estudo. Este valor baseia-se na investigação dos dados históricos do laboratório principal. A equipa de gestão dos dados utilizou, em seguida, este valor em todas as fases do estudo de validação. O principal resultado, Ind-IL8LA, é o rácio de duas médias aritméticas, tal como demonstrado na equação.

Intervalo de confiança de 95 % (IC 95 %)

A precisão desta medida do resultado principal é estimada graças ao intervalo de confiança de 95 % (IC 95 %) baseado no rácio. O limite inferior do IC 95 % ≥ 1 indica que o valor niL8LA à i-ésima concentração é significativamente superior ao valor obtido com o controlo do solvente. O IC 95 % pode ser calculado de várias formas. No presente estudo, foi utilizado o método conhecido como teorema de Fieller. Segundo este teorema, o intervalo de confiança de 95 % obtém-se por recurso à seguinte fórmula:

$$\left[\frac{-B - \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A}, \frac{-B + \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A}\right],$$

em que

$$A = \bar{x}_0^2 - t_{0.975(v)}^2 \times \frac{sd_0^2}{n_0}$$

$$B = -2 \times \bar{x} \times \bar{y}$$

$$C = \bar{y}_i^2 - t_{0.975(v)}^2 \times \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}, \text{ and } n_0 = 4$$

$$\bar{x}_0 = (1/n_0) \times \textstyle\sum_j \mathrm{nIL8LA_{0j}}$$

▼**M8**

$sd_0^2 = \{1/(n_0 - 1)\} \times \sum_j (nIL8LA_{0j} - \overline{x}_0)^2$

$n_{yi} = 4$

$\overline{y}_i = (1/n_{yi}) \times \sum_j (nIL8LA_{ij})$

$sd_{yi}^2 = \{1/(n_{yj} - 1)\} \times \sum_j (nIL8LA_{ij} - \overline{y}_i)^2$

é o percentil 97,5 da distribuição central t com o ν do grau de liberdade, em que

$$\nu = \left(\frac{sd_0^2}{n_0} + \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}\right) / \left\{ \left(\frac{sd_0^2}{n_0}\right)^2 / (n_0 - 1) + \left(\frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}\right) / (n_{yi} - 1) \right\}.$$

Inh-GAPLA (II-SLR-LA)

O valor Inh-GAPLA é um rácio do valor GAPLA médio (SLR-LA) para a repetição da i-ésima concentração, comparativamente ao valor obtido com o controlo do solvente, escrito conforme se segue:

$$Inh - GAPLA_i = \left\{ (1/4) \times \sum_j GAPLA_{ij} \right\} / \left\{ (1/4) \times \sum_j GAPLA_{0j} \right\}.$$

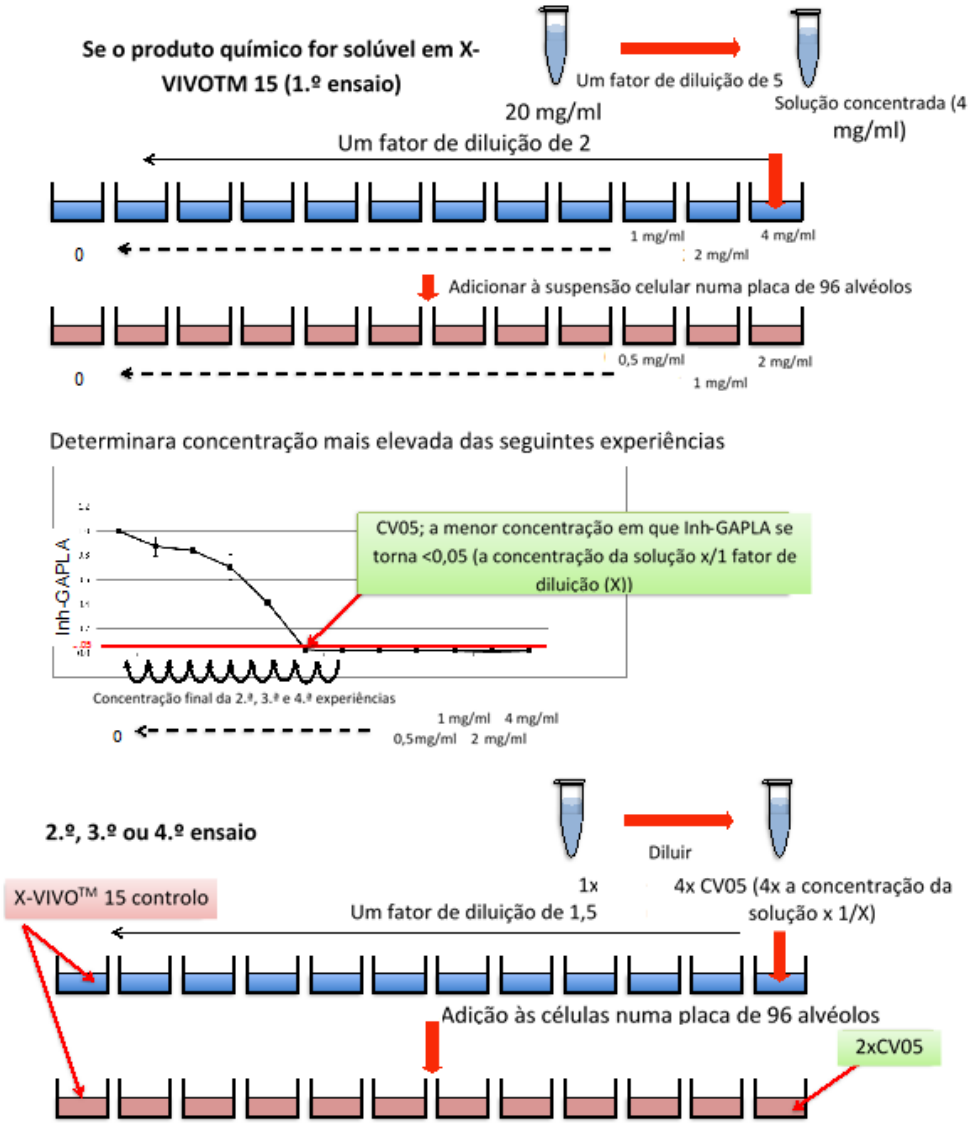
Dado que o valor GAPLA é o denominador da niL8LA, um valor extremamente baixo provoca uma grande variação no valor nIL8LA. Por conseguinte, os valores Ind-IL8LA com um valor extremamente baixo para Inh-GAPLA (inferior a 0,05), podem ser considerados pouco precisos.

▼**M8**

Apêndice 3.5

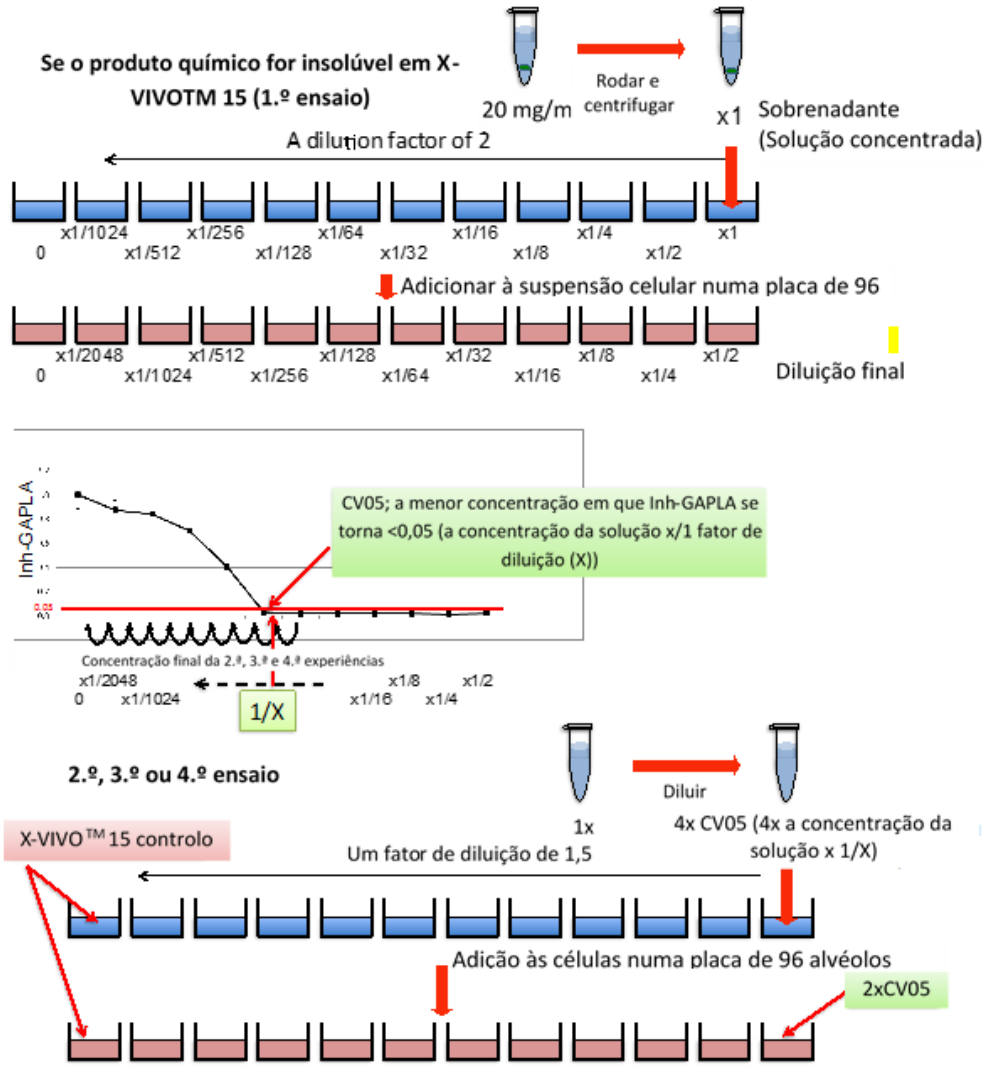
ESQUEMA DOS MÉTODOS DE DISSOLUÇÃO DE PRODUTOS QUÍMICOS PARA O ENSAIO IL-8 LUC.

(a) Para os produtos químicos dissolvidos em X-VIVO™ 15 a 20 mg/ml



▼**M8**

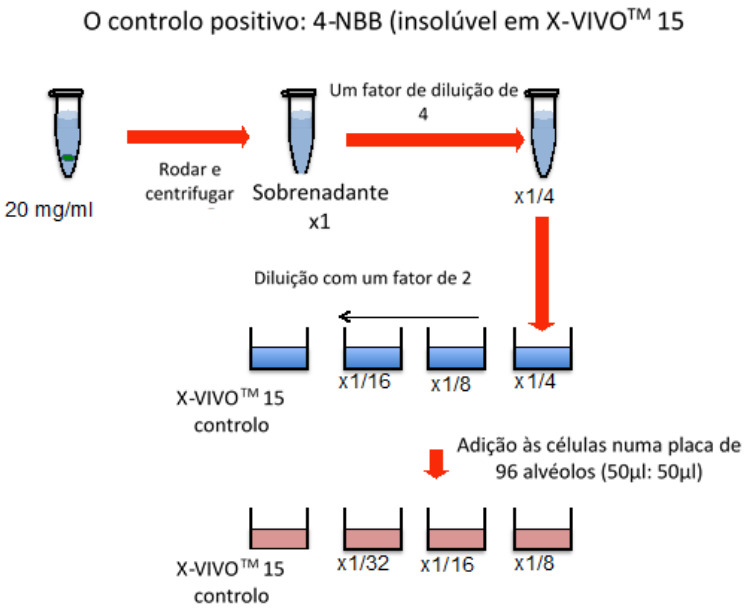
(b) Para produtos químicos insolúveis em X-VIVO™ 15 a 20 mg/ml



▼**M8**

Apêndice 3.6

ESQUEMA DO MÉTODO DE DISSOLUÇÃO DE 4-NBB PARA O CONTROLO POSITIVO DO ENSAIO IL-8 LUC.



▼B

PARTE C: MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DA ECOTOXICIDADE

ÍNDICE

C.1. TOXICIDADE AGUDA PARA OS PEIXES

C.2. ENSAIO DE IMOBILIZAÇÃO AGUDA DA *DAPHNIA* SP.

C.3. ALGAS E CIANOBACTÉRIAS DE ÁGUA DOCE — ENSAIO DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO

C.4. DETERMINAÇÃO DA BIODEGRADABILIDADE «FÁCIL»

PARTE I. CONSIDERAÇÕES GERAIS

PARTE II. ENSAIO DA REDUÇÃO GRADUAL DO COD (método C.4-A)

PARTE III. TESTE DE DESPISTE DA OCDE MODIFICADO (método C.4-B)

PARTE IV. ENSAIO DA LIBERTAÇÃO DE CO_2 (método C.4-C)

PARTE V. ENSAIO DE RESPIROMETRIA MANOMÉTRICA (método C.4-D)

PARTE VI. ENSAIO EM FRASCO FECHADO (método C.4-E)

PARTE VII. ENSAIO DE M.I.T.I. (método C.4-F)

C.5 DEGRADAÇÃO — CARÊNCIA BIOQUÍMICA DE OXIGÉNIO

C.6. DEGRADAÇÃO — CARÊNCIA QUÍMICA DE OXIGÉNIO

C.7. DEGRADAÇÃO — DEGRADAÇÃO ABIÓTICA: HIDRÓLISE EM FUNÇÃO DO PH

C.8. TOXICIDADE EM RELAÇÃO ÀS MINHOCAS

C.9. BIODEGRADAÇÃO — ENSAIO DE ZAHN E WELLENS

C.10. ENSAIO DE SIMULAÇÃO DO TRATAMENTO AERÓBIO DE EFLUENTES C.10-A: UNIDADES DE LAMAS ATIVADAS — C.10-B BIOFILMES

C.11. LAMAS ATIVADAS — ENSAIO DE INIBIÇÃO DA RESPIRAÇÃO (OXIDAÇÃO DO CARBONO E DO AMÓNIO)

C.12. BIODEGRADAÇÃO — ENSAIO L.A.S.C. MODIFICADO

C.13. BIOACUMULAÇÃO EM PEIXES: EXPOSIÇÃO PELAS VIAS AQUOSA E ALIMENTAR

C.14. ENSAIO DE CRESCIMENTO JUVENIL EM PEIXE

C.15. ENSAIO DE TOXICIDADE DE CURTO PRAZO NOS PEIXES EM ESTÁDIO EMBRIONÁRIO E RECÉM-NASCIDOS

C.16. ABELHAS DOMÉSTICAS — ENSAIO DE TOXICIDADE ORAL AGUDA

C.17. ABELHAS DOMÉSTICAS — ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA POR CONTACTO

C.18. ADSORÇÃO/DESSORÇÃO POR RECURSO A UM MÉTODO DE EQUILÍBRIO POR LOTES DE SOLO

▼B

C.19. ESTIMATIVA DO VALOR DO COEFICIENTE DE ADSORÇÃO *(K_{OC})* EM SOLOS E EM LAMAS DE DEPURAÇÃO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)

C.20. ENSAIO DE REPRODUÇÃO COM *DAPHNIA MAGNA*

C.21. MICROORGANISMOS NO SOLO: ENSAIO DE TRANSFORMAÇÃO DE AZOTO

C.22. MICROORGANISMOS NO SOLO: ENSAIO DE TRANSFORMAÇÃO DE CARBONO

C.23. TRANSFORMAÇÕES AERÓBIAS E ANAERÓBIAS NO SOLO

C.24. TRANSFORMAÇÕES AERÓBIAS E ANAERÓBIAS EM SISTEMAS DE SEDIMENTOS AQUÁTICOS

C.25. MINERALIZAÇÃO AERÓBICA EM ÁGUAS DE SUPERFÍCIE — ENSAIO DE SIMULAÇÃO DE BIODEGRADAÇÃO

C.26. ESPÉCIES DO GÉNERO *LEMNA* — ENSAIO DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO

C.27. ENSAIO DE TOXICIDADE EM QUIRONOMÍDEOS NUM SISTEMA SEDIMENTOS-ÁGUA COM SEDIMENTOS ENRIQUECIDOS

C.28. ENSAIO DE TOXICIDADE EM QUIRONOMÍDEOS NUM SISTEMA SEDIMENTOS-ÁGUA COM ÁGUA ENRIQUECIDA

C.29. BIODEGRADABILIDADE "FÁCIL" — CO_2 EM RECIPIENTES FECHADOS (Ensaio do espaço livre)

C.30. BIOACUMULAÇÃO EM OLIGOQUETAS TERRESTRES

C.31. ENSAIO COM PLANTAS TERRESTRES: PROTOCOLO PARA O DESENVOLVIMENTO DE PLÂNTULAS A PARTIR DE SEMENTES

C.32. ENSAIO DE REPRODUÇÃO COM ENQUITREÍDEOS

C.33. ENSAIO DE REPRODUÇÃO DE MINHOCAS (*EISENIA FETIDA/EISENIA ANDREI*)

C.34. DETERMINAÇÃO DA INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DE BACTÉRIAS ANAERÓBIAS — REDUÇÃO DA PRODUÇÃO DE GÁS A PARTIR DE LAMAS DIGERIDAS EM CONDIÇÕES DE ANAEROBIOSE

C.35. ENSAIO DE TOXICIDADE PARA *LUMBRICULUS* NUM SISTEMA SEDIMENTO-ÁGUA COM SEDIMENTO ENRIQUECIDO

C.36. ENSAIO DE REPRODUÇÃO NO SOLO DO ÁCARO PREDADOR *HYPOASPIS (GEOLAELAPS) ACULEIFER*

C.37. ENSAIO A 21 DIAS EM PEIXES: DESPISTAGEM A CURTO PRAZO DE ATIVIDADE ESTROGÉNICA E ANDROGÉNICA E DE INIBIÇÃO DA AROMATASE

C.38. ENSAIO DE METAMORFOSE EM ANFÍBIOS

C.39. ENSAIO DE REPRODUÇÃO DE COLÊMBOLOS NO SOLO

▼B

C.40. ENSAIO DE TOXICIDADE NO CICLO DE VIDA EM QUIRONOMÍDEOS NUM SISTEMA SEDIMENTOS-ÁGUA COM SEDIMENTOS OU ÁGUA ENRIQUECIDOS

C.41. ENSAIO DE DESENVOLVIMENTO SEXUAL EM PEIXES

C.42. BIODEGRADABILIDADE NA ÁGUA DO MAR

C.43. ENSAIO DE BIODEGRADABILIDADE ANAERÓBIA DE SUBSTÂNCIAS ORGÂNICAS EM LAMAS DIGERIDAS: MÉTODO POR MEDIÇÃO DA PRODUÇÃO GASOSA

C.44. LIXIVIAÇÃO EM COLUNAS DE SOLO

C.45. ESTIMATIVA DAS EMISSÕES PARA O AMBIENTE DE MADEIRAS TRATADAS COM PRODUTOS DE PRESERVAÇÃO DA MADEIRA: MÉTODO LABORATORIAL PARA ARTIGOS DE MADEIRA SEM COBERTURA E EM CONTACTO COM ÁGUA DOCE OU COM ÁGUA DO MAR

C.46. BIOACUMULAÇÃO EM OLIGOQUETAS BENTÓNICOS SEDIMENTARES

C.47. ENSAIO DE TOXICIDADE NOS PRIMEIROS ESTÁDIOS DE VIDA EM PEIXES

C.48. ENSAIO CURTO DE EFEITOS NA REPRODUÇÃO EM PEIXES

C.49. ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA EM EMBRIÕES DE PEIXES (FET)

C.50. ENSAIO DE TOXICIDADE EM *MYRIOPHYLLUM SPICATUM* SEM SEDIMENTOS

C.51. ENSAIO DE TOXICIDADE DE *MYRIOPHYLLUM SPICATUM* ÁGUA-SEDIMENTO

C.52. ENSAIO ALARGADO DE REPRODUÇÃO NUMA GERAÇÃO EM PEIXE DO ARROZ-JAPONÊS (MEOGRT)

C.53. ENSAIO DE CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO DE LARVAS DE ANFÍBIOS (LAGDA)

▼B

C.1. **TOXICIDADE AGUDA PARA OS PEIXES**

1. **MÉTODO**

1.1. INTRODUÇÃO

O objectivo deste ensaio consiste em determinar a toxicidade letal aguda de uma substância para os peixes de água-doce. Tanto quanto possível é desejável possuir informações sobre a solubilidade na água, a pressão de vapor, a estabilidade química, as constantes de dissociação e a biodegradabilidade da substância para auxiliar a seleccionar o método de ensaio mais apropriado (estático, semiestático ou por escoamento) para garantir concentrações constantes satisfatórias da substância de ensaio durante o período desse ensaio.

Ao fazer-se o planeamento do ensaio e a interpretação dos resultados devem tomar-se em consideração as informações adicionais disponíveis (por exemplo, fórmula estrutural, grau de pureza, natureza e percentagem das impurezas significativas, presença e quantidades de aditivos, coeficiente de partição n-octanol/água).

1.2. DEFINIÇÕES E UNIDADES

A toxicidade aguda é o efeito adverso perceptível induzido num organismo ao fim de um curto período de tempo (alguns dias) de exposição a uma substância. Neste ensaio, exprime-se a toxicidade aguda pelo valor da concentração letal cinquenta (CL_{50}), isto é, a concentração em água que mata 50 % dos peixes que constituem o grupo submetido a ensaio decorrido um período contínuo de exposição o qual deve ser especificado.

Todas as concentrações da substância de ensaio são dadas em peso por volume (miligramas por litro). As concentrações também podem ser expressas em peso por peso (mg/kg^{-1}).

1.3. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

Pode fazer-se o ensaio com uma substância de referência para se demonstrar que, sob as condições de ensaio laboratoriais, a resposta das espécies testadas não se modificou significativamente.

Para este ensaio não estão especificadas quaisquer substâncias de referência.

1.4. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

Pode efectuar-se um teste-limite para a concentração de 100 mg por litro no sentido de se demonstrar que o valor CL_{50} é superior a esta concentração.

Os peixes são expostos à substância de ensaio misturada com água, num determinado intervalo de concentrações, durante um período de 96 horas. Procede-se ao registo do número de mortes em intervalos de 24 horas pelo menos e calcula-se, sempre que possível, as concentrações que matam 50 % dos peixes (CL_{50}) em cada momento de observação.

1.5. CRITÉRIOS DE QUALIDADE

Os critérios de qualidade deverão ser aplicados ao teste-limite e também no método do teste global.

A mortalidade nos controlos não deve exceder o valor de 10 % (ou um peixe no caso de se utilizar menos de dez peixes) no termo do ensaio.

A concentração do oxigénio dissolvido deve ser superior a 60 % do valor da saturação com ar.

▼B

A concentração da substância de ensaio deverá ser mantida a cerca de 80 % do valor da concentração inicial, ao longo do período de duração do ensaio.

Para as substâncias que se dissolvem facilmente no meio de ensaio, dando origem a soluções estáveis, isto é, para as substâncias que não são significativamente volatilizáveis, degradáveis, hidrolisáveis ou adsorvidas, pode considerar-se a concentração inicial como equivalente ao valor da concentração nominal. Dever-se-á demonstrar que as concentrações foram mantidas durante todo o ensaio e que os critérios de qualidade foram satisfeitos.

Para as substâncias que são:

i) fracamente solúveis no meio de ensaio, ou

ii) susceptíveis de formar emulsões ou dispersões estáveis, ou

iii) instáveis em soluções aquosas,

pode considerar-se a concentração inicial como sendo a concentração medida na solução (ou, no caso de ser tecnicamente impossível, medida na coluna de água) no início do ensaio. A concentração deverá ser determinada após um período de equilíbrio, mas antes da introdução dos peixes de ensaio.

Em quaisquer desses casos é necessário efectuar outras medições durante o ensaio, para se confirmar que as concentrações da exposição e os critérios de qualidade foram respeitados.

O valor do pH não deverá variar mais de uma unidade.

1.6. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

É possível utilizar três tipos de procedimentos:

Ensaio estático:

Trata-se de um ensaio de toxicidade em que não ocorre qualquer fluxo da solução de ensaio. (As soluções permanecem inalteradas durante o período do ensaio.)

Ensaio semiestático:

Trata-se de um ensaio sem fluxo da solução de ensaio, mas com renovação regular das soluções de ensaio após períodos prolongados (por exemplo, 24 horas).

Ensaio por escoamento:

Trata-se de um ensaio de toxicidade em que a água é renovada constantemente nas câmaras de ensaio, sendo a substância química de ensaio transportada com a água utilizada para renovar o meio de ensaio.

1.6.1. **Reagentes**

1.6.1.1. *Soluções das substâncias de ensaio*

As soluções de reserva com a concentração pretendida são preparadas dissolvendo a substância em água desionizada ou simplesmente em água, de acordo com o ponto 1.6.1.2.

As concentrações escolhidas para o ensaio são preparadas por diluição da solução de reserva. Se se realiza um ensaio com concentrações elevadas, a substância pode ser diluída directamente na água de diluição.

▼B

Normalmente as substâncias apenas deverão ser testadas até ao limite de solubilidade. Para algumas substâncias (por exemplo, substâncias que possuem fraca solubilidade em água, ou com um valor P_{ow} elevado, ou para aquelas que formam dispersões estáveis em vez de uma verdadeira solução em água), é aceitável efectuar a experiência com uma concentração superior ao limite de solubilidade da substância para garantir a obtenção da máxima concentração solúvel/estável. Todavia é importante que essa concentração não perturbe, por qualquer forma, o sistema de ensaio (por exemplo, formação de uma película da substância sobre a superfície da água evitando a sua oxigenação, etc.).

É possível recorrer à dispersão ultra-sónica, a solventes orgânicos, a emulsionantes ou a dispersantes para auxiliar a preparação das soluções de reserva de substâncias com fraca solubilidade na água ou para auxiliar a dispersão dessas substâncias no meio de ensaio. Quando se utilizam essas substâncias auxiliares todas as concentrações de ensaio deverão conter a mesma quantidade de substância auxiliar e dever-se-á expor os peixes de ensaio de controlo adicional a uma concentração da substância auxiliar idêntica à utilizada nas séries de ensaio. A concentração dessas substâncias auxiliares deverá ser mínima e em caso algum deve exceder 100 mg por litro de meio de ensaio.

O ensaio deve ser efectuado sem ajustamento do valor de pH. Se houver sinais evidentes de uma alteração nítida dos valores de pH, é aconselhável repetir o ensaio com ajustamento desses valores e efectuar-se o registo dos resultados. Nesse caso ajustar-se-á o valor do pH da solução de reserva para o valor de pH da água de diluição, salvo se houver razões específicas para não se proceder desse modo. Para satisfazer este objectivo é preferível utilizar HC1 e NaOH. Este ajustamento do valor do pH deverá ser efectuado de tal modo que a concentração da substância de ensaio na solução de reserva não varie significativamente. No caso de ocorrer qualquer reacção química ou precipitação do composto de ensaio, provocada por esse ajustamento, deve descrever-se tal facto.

1.6.1.2. *Água de confinação e de diluição*

Utiliza-se uma fonte de água potável (não contaminada por concentrações potencialmente nocivas de cloro, de metais pesados ou de outras substâncias), água natural de boa qualidade ou água reconstituída (ver apêndice 1). É preferível utilizar águas com uma dureza total compreendida entre 10 e 250 mg de $CaCO_3$ por litro e com um valor de pH compreendido entre 6,0 e 8,5.

1.6.2. **Aparelho**

Todos os aparelhos devem ser feitos com materiais quimicamente inertes.

— sistema de diluição automático (para o ensaio por escoamento),

— medidor de oxigénio,

— equipamento para a determinação da dureza da água,

— aparelho adequado para o controlo de temperatura,

— medidor de pH.

1.6.3. **Peixes de experiência**

Os peixes devem estar em boas condições de saúde e não devem ser portadores de qualquer defeito físico aparente.

▼B

As espécies utilizadas deverão ser seleccionadas tomando como base critérios práticos tais como a sua fácil disponibilidade ao longo do ano, a facilidade da sua manutenção, a conveniência de os submeter a ensaio, a sua sensibilidade relativa às substâncias químicas, e quaisquer factores económicos, biológicos ou ecológicos significativos. Quando se faz a selecção das espécies de peixes deve ter-se presente a necessidade de efectuar um estudo comparando os resultados obtidos com os resultados existentes relativos à harmonização internacional (referência 1).

No apêndice 2 encontra-se uma listagem das espécies de peixes recomendadas para a realização deste ensaio; as espécies preferenciais são o peixe-zebra e a truta-arco-íris.

1.6.3.1. *Confinação*

Preferencialmente os peixes deverão ser provenientes de uma reserva única em que todos possuem a mesma idade e comprimento. Os peixes devem ser confinados durante pelo menos 12 dias nas condições seguintes:

Carga:

apropriada ao sistema (recirculação ou escoamento) e às espécies de peixes;

Água:

ver ponto 1.6.1.2;

Luz:

fotoperíodo diário de 12 a 16 horas;

Concentração do oxigénio dissolvido:

pelo menos 80 % do valor da saturação com ar;

Alimentação:

três vezes por semana ou diariamente, cessando 24 horas antes do início do ensaio.

1.6.3.2. *Mortalidade*

Após um período de ajustamento de 48 horas procede-se ao registo das mortalidades aplicando os critérios seguintes:

— superior a 10 % da população, em sete dias:

rejeição de todo o lote,

— entre 5 % e 10 % da população:

prolonga-se o período de confinação durante mais sete dias.

Se não houver mais mortalidades, o lote é aceitável; caso contrário deve ser rejeitado,

— menos do que 5 % da população:

aceita-se o lote.

1.6.4. **Adaptação**

Os peixes devem ser mantidos, nas condições do ensaio relativas à qualidade da água e à temperatura, durante pelo menos sete dias antes do início deste.

▼B

1.6.5. **Procedimento de ensaio**

Antes do ensaio definitivo pode efectuar-se um ensaio preliminar no sentido de se obter informação sobre as concentrações que devem ser utilizadas no ensaio principal.

Para além das séries de ensaio efectua-se uma experiência de controlo sem a substância de ensaio, e, se for relevante, efectua-se também uma experiência de controlo contendo a substância auxiliar.

Consoante as propriedades físicas e químicas do composto de ensaio, assim será seleccionado um ensaio estático, semiestático ou por escoamento, para satisfazer os critérios de qualidade.

Os peixes são expostos à substância de ensaio conforme a seguir descrito:

— duração: 96 horas,

— número de animais: pelo menos sete para cada concentração,

— tanques: com capacidade adequada em relação à carga recomendada,

— carga: recomenda-se uma carga máxima de 1,0 g por litro para os ensaios estático e semiestático; para os sistemas de escoamento é aceitável uma carga superior,

— concentração de ensaio: utilizar-se-ão pelo menos cinco concentrações afastadas entre si por um factor constante inferior a 2,2, e abrangendo tanto quanto possível o intervalo de mortalidade compreendido entre 0 e 100 %,

— água: ver ponto 1.6.1.2,

— luz: fotoperíodo diário de 12 a 16 horas,

— temperatura: apropriada às espécies (apêndice 2) não variando de ± 1°C para cada ensaio particular,

— concentração do oxigénio dissolvido: não inferior a 60 % do valor da saturação com ar, para o valor de temperatura seleccionado,

— alimentação: nenhuma.

Os peixes são inspeccionados decorridas as duas a quatro horas iniciais e pelo menos em intervalos de 24 horas. Considera-se que os peixes estão mortos se o toque no pedúnculo caudal não produzir qualquer reacção e se não houver movimentos respiratórios visíveis. Regista-se o número de peixes mortos e faz-se a sua remoção. Regista-se também as anomalias visíveis (por exemplo, perda de equilíbrio, alterações do comportamento natatório, função respiratória, pigmentação, etc.).

Diariamente proceder-se-á à medição dos valores de pH, do oxigénio dissolvido e da temperatura.

Teste-limite

Utilizando o procedimento descrito neste método de ensaio é possível efectuar um teste-limite para a concentração de 100 mg por litro no sentido de se demonstrar que o valor CL_{50} é superior a esta concentração.

Se a natureza da substância for tal que não seja possível obter uma concentração de 100 mg por litro, o teste-limite deverá ser efectuado para um valor de concentração igual à solubilidade da substância (ou igual à concentração máxima que forma uma dispersão estável) no meio utilizado (ver também o ponto 1.6.1.1).

▼B

O teste-limite deverá ser efectuado utilizando sete a dez peixes, utilizando-se o mesmo número nos controlos. (A teoria do binómio estabelece que no caso de se utilizar dez peixes com mortalidade 0, existe um intervalo de confiança de 99,9 % em que o valor CL_{50} é superior à concentração utilizada no teste-limite. Com sete, oito ou nove peixes, a ausência de mortalidade proporciona um intervalo de confiança de pelo menos 99 % em que o valor CL_{50} é superior à concentração utilizada.)

Se houver mortalidade deve efectuar-se um estudo completo. No caso de serem observados efeitos subletais, estes deverão ser registados.

2. **RESULTADOS E AVALIAÇÃO**

Para cada período de observações registadas (24, 48, 72 e 96 horas), traça-se a curva da percentagem de mortalidade para cada período de exposição recomendada em função da concentração utilizando papel logarítmico/probabilidade.

Sempre que possível e para cada momento de observação deve estimar-se o valor CI_{50} e os limites de confiança (p = 0,05), utilizando procedimentos normalizados; esses valores deverão ser aproximados para um ou, no máximo, dois algarismos significativos (exemplos de arredondamento para dois algarismos: de 173,5 para 174; de 0,127 para 0,13; de 1,21 para 1,2).

Nos casos em que o declive da curva de resposta concentração/percentagem é muito acentuado para permitir o cálculo do valor CL_{50}, considera-se suficiente uma estimativa gráfica deste valor.

No caso de duas concentrações consecutivas, sendo a razão entre elas 2,2, proporcionarem apenas mortalidades de 0 e 100 %, considera-se que esses dois valores são suficientes para indicar o intervalo de localização do valor CL_{5O}.

No caso de se verificar que a estabilidade ou a homogeneidade da substância de ensaio não pode ser mantida, dever-se-á descrever esse facto e é necessário tomar precauções na interpretação dos resultados.

3. **RELATÓRIO**

O relatório do ensaio deverá conter, se possível, a informação seguinte:

— informação sobre o peixe de ensaio (designação científica, estirpe, fornecedor, qualquer tratamento prévio, dimensões e número utilizado para cada concentração de ensaio),

— fonte da água de diluição e características químicas principais (pH, dureza, temperatura),

— no caso de uma substância de fraca solubilidade aquosa, indicar-se-á o método de preparação das soluções de reserva e de ensaio,

— concentração de quaisquer substâncias auxiliares,

— enumeração das concentrações utilizadas e qualquer informação disponível sobre a estabilidade para essas concentrações da substância química de ensaio, na solução de ensaio,

— no caso de se efectuarem análises químicas, indicar os métodos utilizados e os resultados,

— resultados do teste-limite, se existirem,

— razões para a escolha e pormenores sobre o procedimento de ensaio utilizado (por exemplo, método estático, semiestático, razão entre doses, débito do escoamento, arejamento, número de peixes, etc.),

▼B

— descrição do equipamento de ensaio,

— regime de exposição à luz,

— concentrações do oxigénio dissolvido, valor de pH e temperaturas das soluções de ensaio em cada 24 horas,

— provas demonstrativas de que os critérios de qualidade foram cumpridos,

— um quadro apresentando a mortalidade cumulativa para cada concentração e para o controlo (e, se necessário, para o controlo com a substância auxiliar) em cada um dos momentos de observação recomendados,

— gráfico da curva de resposta concentração/percentagem no fim do ensaio,

— sempre que possível, os valores CL_{50} em cada um dos momentos de observação recomendados (com limites de confiança de 95 %),

— procedimentos estatísticos para a determinação dos valores CL_{50},

— no caso de se utilizar uma substância de referência, os resultados obtidos,

— valor da mais elevada concentração de ensaio que não provoca mortalidade durante o período do ensaio,

— valor da mais fraca concentração que provoca 100 % de mortalidade durante o período do ensaio.

4. **REFERÊNCIAS**

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 203, Decision of the Council C(81) 30 final and updates.

(2) AFNOR — Determination of the acute toxicity of a substance to *Brachydanio rerio* — Static and Flow Through methods — NFT 90-303 June 1985.

(3) AFNOR — Determination of the acute toxicity of a substance to *Salmo gairdneri* — Static and Flow Through methods — NFT 90-305 June 1985.

(4) ISO 7346/1,/2 and/3 — Water Quality — Determination of the acute lethal toxicity of substances to a fresh water fish *(Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan — *Teleostei, Cyprinidae).* Part 1: Static method. Part 2: Semi-static method. Part 3: Flow-through method.

(5) Eidgenössisches Department des Innern, Schweiz: Richtlinien fur Probenahme und Normung von Wasseruntersuchungsmethoden — Part II 1974.

(6) DIN Testverfahren mit Wasserorganismen, 38 412 (L1) und L (15).

(7) JIS K 0102, Acute toxicity test for fish.

(8) NEN 6506 — Water — Bepaling van de akute toxiciteit met behulp van *Poecilia reticulata,* 1980.

(9) Environmental Protection Agency, Methods for the acute toxicity tests with fish, macroinvertebrates and amphibians. The Committee on Methods for Toxicity Tests with Aquatic Organisms, Ecological Research Series EPA-660-75-009, 1975.

(10) Environmental Protection Agency, Environmental monitoring and support laboratory, Office of Research and Development, EPA-600/4-78-012, January 1978.

▼B

(11) Environmental Protection Agency, Toxic Substance Control, Part IV, 16 March 1979.

(12) Standard methods for the examination of water and wastewater, 14th edition, APHA-AWWA-WPCF, 1975.

(13) Commission of the European Communities, Inter-laboratory test programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to the fish. EEC Study D.8368, 22 March 1979.

(14) Verfahrensvorschlag des Umweltbundesamtes zum akuten Fisch-Test. Rudolph, P. und Boje, R. Ökocoxikologie, Grundlagen für die Ökotoxikologische Bewertung von Umweltchemikalien nach dem Chemikaliengesetz, ecomed 1986.

(15) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F., A simplified method for evaluating dose effects experiments, J. Pharm, Exp. Therap., 1949, vol. 96, 99.

(16) Finney, D.J. Statistical Methods in Biological Assay. Griffin, Weycombe, U.K., 1978.

(17) Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. Bioassay methods for acute toxicity. Water Res., 1969, vol. 3, 793-821.

(18) Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. II Utilising and applying bioassay results. Water Res. 1970, vol. 4, 3-32.

(19) Stephan, C.E. Methods for calculating an LC_{50}. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelink). American Society for Testing and Materials, ASTM STP 634, 1977, 65-84.

(20) Stephan, C.E., Busch, K.A., Smith, R., Burke, J. and Andrews, R.W. A computer program for calculating an LC_{50}. US EPA.

▼B

Apêndice 1

Água reconstituída

Exemplo de uma água adequada para diluição

Todas as substâncias químicas devem ser de qualidade analítica.

A água deve ser destilada e de boa qualidade, ou desionizada com uma condutividade inferior a 5 μScm^{-1}.

O aparelho para a destilação da água não deve conter quaisquer partes feitas de cobre.

Soluções de reserva

$CaCl_2$. $2H_2O$ (cloreto de cálcio dihidratado): 11,76 g

Dissolve-se em água e ajusta-se o volume até 1 litro utilizando água.

$MgSO_4$. $7H_2O$ (sulfato de magnésio heptahidratado): 4,93 g

Dissolve-se em água e ajusta-se o volume até 1 litro utilizando água.

$NaHCO_3$ (hidrogenocarbonato de sódio): 2,59 g

Dissolve-se em água e ajusta-se o volume até 1 litro utilizando água.

KCl (cloreto de potássio): 0,23 g

Dissolve-se em água e ajusta-se o volume até 1 litro utilizando água.

Água de diluição reconstituída

Mistura-se 25 ml de cada uma das quatro soluções de reserva e ajusta-se o volume até 1 litro utilizando água.

Faz-se o arejamento até que a concentração do oxigénio dissolvido seja igual ao valor da saturação com ar.

O pH deve ser 7,8± 0,2.

Se necessário ajusta-se o valor do pH com NaOH (hidróxido de sódio) ou com HCl (ácido clorídrico).

A água para diluição assim preparada é colocada à parte durante 12 horas e não deve ser mais arejada.

A soma dos iões Ca e Mg nesta solução é de 2,5 mmol por litro. A razão entre os iões Ca:Mg é de 4:1 e entre os iões Na:K é de 10:1. A alcalinidade total desta solução é de 0,8 mmol por litro.

Qualquer desvio na preparação da água de diluição não deve modificar a composição ou as propriedades da água.

▼B

Apêndice 2

Espécies de peixes recomendadas para ensaio

Espécies recomendadas	Intervalo recomendado para as temperaturas de ensaio (°C)	Comprimento total recomendado para os animais do ensaio (cm)
Brachydanio rerio (Teleostei, Cyprinidae) (Hamil-ton-Buchanan) Peixinho-zebra	20 a 24	3,0± 0,5
Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) (Rafi-nesque) Peixinho-cabeça-gorda	20 a 24	5,0 ±2,0
Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus 1758) Carpa	20 a 24	6,0 ±2,0
Oryzias latipes (Teleostei, Poeciliiae) Cyprinodonti-dae (Tomminck et Schlegel 1850) Peixe-arroz-do-Ja-pão	20 a 24	3,0 ±1,0
Poecilia reticulata (Teleostei, Poeciliidae) (Peters 1859) Gupi	20 a 24	3,0 ±1,0
Lepomis macrochirus (Teleostei, Centrar-chídae) (Rafinesque Linnaeus 1758) Perca-azul	20 a 24	5,0 ±2,0
Onchorhynchus mykiss (Teleostei, Salmoni-dae) (Walbaum 1988) Truta-arco-íris	12 a 17	6,0 ±2,0
Leuciscus idus (Teleostei, Cyprinidae) (Lin-naeus 1758) Escalo-prateado	20 a 24	6,0± 2,0

Obtenção dos peixes

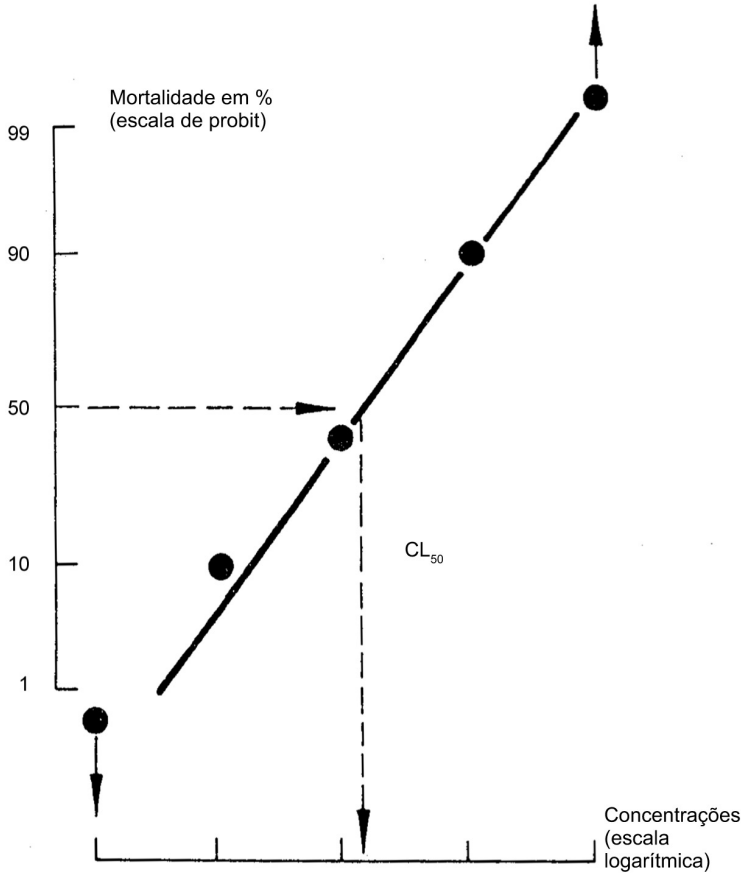
Os peixes acima enumerados são fáceis de criar e amplamente disponíveis ao longo do ano. É fácil criá-los e mantê-los em instalações piscícolas ou em laboratórios, sob condições de controlo de doenças e de parasitas, de tal modo que os animais sejam saudáveis e de origem conhecida. Estes peixes existem em muitas partes do mundo.

▼B

Apêndice 3

Exemplo de concentração: mortalidade percentual

Exemplo da determinação do valor CL_{50} utilizando papel log-probit



▼B

C.2. **ENSAIO DE IMOBILIZAÇÃO AGUDA DA *DAPHNIA* SP.**

1. **MÉTODO**

O presente método de ensaio de imobilização aguda é equivalente ao descrito na publicação OECD TG 202 (2004).

1.1. INTRODUÇÃO

O presente método descreve um ensaio de toxicidade aguda para avaliação dos efeitos das substâncias químicas nos dafnídeos. Na medida do possível, foram utilizados métodos de ensaio já existentes (1) (2) (3).

1.2. DEFINIÇÕES

NO ÂMBITO DO PRESENTE MÉTODO, UTILIZAM-SE AS SEGUINTES DEFINIÇÕES:

CE_{50}: estimativa da concentração necessária para imobilizar 50 % dos dafnídeos num dado período de exposição. Caso seja utilizada outra definição, a definição utilizada e a respectiva referência devem ser especificadas.

Imobilização: Os animais incapazes de nadar decorridos 15 segundos, após agitação suave do recipiente de ensaio, são considerados imobilizados.

1.3. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

Dafnídeos jovens, com menos de 24 horas no início do ensaio, são expostos por um período de 48 horas a diferentes concentrações da substância a ensaiar. Decorridas 24 horas e 48 horas, respectivamente, a imobilização é registada e comparada com valores-testemunha. Os resultados são depois analisados para cálculo da CE_{50} às 48h (para as definições, ver ponto 1.2). A determinação da CE_{50} às 24h é facultativa.

1.4. INFORMAÇÃO SOBRE A SUBSTÂNCIA A ENSAIAR

A solubilidade em água e a pressão de vapor da substância a ensaiar deverão ser conhecidas, devendo existir um método analítico fiável para a quantificação da substância nas soluções de ensaio, relativamente ao qual estejam descritos a eficiência de recuperação e o limite de determinação. A fórmula estrutural, o grau de pureza, a estabilidade em água ou a estabilidade à luz, o P_{ow} e os resultados de um ensaio de biodegradabilidade «fácil» da substância a ensaiar constituem informações úteis (ver método C.4).

Nota: Na referência (4) são dadas orientações para o ensaio de substâncias cujas propriedades físico-químicas dificultam o respectivo ensaio.

1.5. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

Pode fazer-se a determinação da CE_{50} duma substância de referência, para garantia da fiabilidade das condições de ensaio. Recomendam-se, para este efeito, os tóxicos utilizados em ensaios interlaboratoriais (1) (5) ([1]). Recomenda-se repetir o ensaio das substâncias de referência mensalmente ou, no mínimo, duas vezes por ano.

([1]) De acordo com estes ensaios interlaboratoriais, bem como com a rectificação técnica à norma ISO 6341, a CE_{50} — 24 h do dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) está compreendida entre 0,6 mg/l e 1,7 mg/l.

▼B

1.6. CRITÉRIOS DE QUALIDADE

Um ensaio é considerado válido quando satisfaz os seguintes critérios:

— nos tratamentos-testemunha, incluindo o que contém o agente solubilizante, a proporção de dafnídeos imobilizados não excede 10 %,

— a concentração de oxigénio dissolvido no final do ensaio é > 3 mg/l, tanto nos recipientes das testemunhas como nos dos tratamentos.

Nota: Em relação ao primeiro critério, a proporção de dafnídeos--testemunha imobilizados ou com outros sinais de doença ou distúrbios — por exemplo, alterações da cor ou comportamentos anómalos, tais como retenção à superfície da água — não deve exceder 10 %.

1.7. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.7.1. **Equipamento**

Os recipientes de ensaio, e restante equipamento que entre em contacto com as soluções de ensaio, devem ser exclusivamente de vidro ou outro material quimicamente inerte. Para o ensaio utilizar-se-ão normalmente tubos de ensaio ou copos, que devem ser limpos antes de cada utilização seguindo procedimentos normais de laboratório. Os recipientes de ensaio devem ser tapados mas não vedados, de forma a reduzir a perda de água por evaporação e evitar que entre poeira nas soluções. O ensaio de substâncias voláteis deve ser feito em recipientes completamente cheios e fechados, suficientemente grandes para que o teor de oxigénio não se torne limitante ou demasiado baixo (ver ponto 1.6 e primeiro parágrafo do ponto 1.8.3).

Utilizar-se-á ainda o seguinte equipamento, na totalidade ou em parte: medidor de oxigénio (com microeléctrodo ou outro equipamento adequado para a medição do oxigénio dissolvido em amostras de volume reduzido); medidor de pH; aparelho adequado para o controlo da temperatura; equipamento para a determinação da concentração de carbono orgânico total (COT); equipamento para a determinação da carência química de oxigénio (CQO); equipamento para a determinação da dureza, etc.

1.7.2. **Organismos experimentais**

A espécie preferida é a *Daphnia magna* Straus, embora possam também utilizar-se outras espécies adequadas de *Daphnia* (por exemplo, *Daphnia pulex*). No início do ensaio, os animais devem ter menos de 24 horas de vida; a fim de reduzir a variabilidade, recomenda-se vivamente que não provenham da primeira postura do progenitor. Devem provir de uma população saudável [isto é, não evidenciar sinais de distúrbios, tais como elevada mortalidade, presença de machos e ovos de resistência (*ephippia*), atraso na primeira postura, animais com alterações na cor, etc.]. Todos os organismos utilizados num determinado ensaio devem provir de culturas da mesma população de dafnídeos. Os animais dessa população devem ser mantidos em condições de cultura (luz, temperatura, meio) semelhantes às que irão ser utilizadas no ensaio. Se o meio de cultura a utilizar no ensaio for diferente do normalmente utilizado para a cultura de dafnídeos, é aconselhável prever um período de aclimatação antes do ensaio. Para o efeito, os dafnídeos devem ser mantidos em água de diluição à temperatura do ensaio pelo menos durante as 48 horas anteriores ao início do ensaio.

▼B

1.7.3. **Águas de cultura e de diluição**

Para a cultura e a diluição pode utilizar-se água natural (superficial ou subterrânea), água reconstituída ou água da torneira desclorada, desde que os dafnídeos sobrevivam durante todo o período de cultura, de aclimatação e de ensaio sem evidenciar sinais de distúrbios. Qualquer água conforme às características químicas de uma água de diluição aceitável, enunciadas no apêndice 1, é adequada para o ensaio. A qualidade de água deve ser mantida constante durante o decorrer do ensaio. A água reconstituída pode ser preparada juntando a água desionizada ou destilada quantidades determinadas de reagentes de qualidade analítica reconhecida. Nos documentos indicados nas referências (1) e (6) e no apêndice 2 são dados exemplos de água reconstituída. Saliente-se que os meios contendo quelantes conhecidos, tais como os meios M4 e M7 do apêndice 2, devem ser evitados no ensaio de substâncias que contenham metais. O pH deve estar compreendido no intervalo de 6 a 9. Recomenda-se uma dureza compreendida entre 140 e 250 mg/l (expressa em $CaCO_3$), para a *Daphnia magna,* ao passo que para outras espécies de *Daphnia* podem ser também adequadas durezas menores. A água de diluição pode ser arejada antes da utilização no ensaio, de forma a que a concentração de oxigénio dissolvido atinja a saturação.

Se for utilizada água natural, os parâmetros de qualidade devem ser medidos pelo menos duas vezes por ano, ou sempre que haja suspeita de que as características indicadas (ver parágrafos anteriores e apêndice 1) possam ter variado de modo significativo. Deve também determinar-se o teor de metais pesados (Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni, etc.). Se for utilizada água da torneira desclorada, é aconselhável determinar diariamente o teor de cloro. Se a água de diluição provier de um manancial subterrâneo ou superficial, devem ser determinados a condutividade e o carbono orgânico total (COT) ou a carência química de oxigénio (CQO).

1.7.4. **Soluções de ensaio**

De um modo geral, as soluções de ensaio com as concentrações escolhidas são preparadas por diluição de uma solução-padrão. As soluções-padrão devem ser preparadas, de preferência, por dissolução da substância a ensaiar na água de diluição. Deve evitar-se, tanto quanto possível, a utilização de solventes, emulsionantes ou dispersantes. No entanto, tais compostos podem ser necessários, em alguns casos, para produzir uma solução-padrão com a concentração adequada. O documento indicado na referência (4) contém orientações quanto aos solventes, emulsionantes e dispersantes mais adequados. Em qualquer dos casos, o teor de substância ensaiada presente nas soluções de ensaio nunca deve exceder o limite de solubilidade na água de diluição.

O ensaio deve ser efectuado sem ajustamento do pH. Se o pH não se mantiver no intervalo de 6 a 9 será efectuado outro ensaio, ajustando o pH da solução-padrão ao da água de diluição antes da adição da substância a ensaiar. O ajustamento do pH deve ser efectuado de modo a não provocar alteração significativa da concentração da solução-padrão, nem causar qualquer reacção química ou precipitação da substância ensaiada. Devem utilizar-se, de preferência, HCl e NaOH.

▼B

1.8. PROCEDIMENTO

1.8.1. **Condições de exposição**

1.8.1.1. *Grupos tratados e grupos-testemunha*

Encher os recipientes de ensaio com volumes adequados de água de diluição e de soluções da substância a ensaiar. A relação ar/água, em volume, deve ser a mesma nos recipientes dos grupos tratados e dos grupos-testemunha. Colocar, em seguida, os dafnídeos nos recipientes de ensaio. Para cada concentração ensaiada e para os grupos-testemunha devem ser utilizados pelo menos 20 animais, de preferência divididos em quatro grupos de cinco animais. Deve haver um volume de pelo menos 2 ml de solução de ensaio por animal (ou seja, um volume de 10 ml para cinco dafnídeos por recipiente). O ensaio pode ser realizado utilizando o sistema de renovação semiestático ou, quando a concentração da substância ensaiada não for estável, o sistema de escoamento.

A par da série de tratamentos, deve ser realizada uma série-testemunha com água de diluição e, se aplicável, uma série-testemunha com o agente de solubilização.

1.8.1.2. *Concentrações ensaiadas*

Pode ser realizado um ensaio prévio para determinação da gama de concentrações a utilizar no ensaio propriamente dito, excepto nos casos em que existam informações quanto à toxicidade da substância a ensaiar. Para o efeito, os dafnídeos devem ser expostos a concentrações da substância a ensaiar bastante espaçadas entre si. Devem ser expostos a cada concentração ensaiada cinco dafnídeos, durante 48 horas ou menos, não sendo necessárias repetições. O período de exposição pode ser encurtado (por exemplo, 24 horas ou menos) se for possível obter em menos tempo as informações necessárias à determinação da gama de concentrações a utilizar.

Devem ser ensaiadas pelo menos cinco concentrações, numa progressão geométrica cuja razão não deve, de preferência, ser superior a 2,2. Deve fornecer-se uma justificação quando se utilizem menos de cinco concentrações. De preferência, a concentração máxima deveria resultar em 100 % de imobilização e a concentração mínima não ter efeitos observáveis.

1.8.1.3. *Condições de incubação*

A temperatura deve estar compreendida no intervalo de 18°C a 22°C, não devendo a variação em cada ensaio exceder ± 1°C. Recomenda-se um ciclo de 16 horas de luz e 8 horas de escuridão. Pode também optar-se pela escuridão completa, sobretudo se a substância ensaiada for instável à luz.

Os recipientes não devem ser arejados durante o ensaio. O ensaio é efectuado sem ajustamento do pH. Os dafnídeos não devem ser alimentados durante o ensaio.

1.8.1.4. *Duração*

A duração do ensaio é de 48 horas.

1.8.2. **Observações**

24 horas e 48 horas após o início do ensaio, os recipientes devem ser observados para contagem dos dafnídeos imobilizados (ver definições no ponto 1.2). Além da imobilização, deve ser registado também qualquer comportamento ou aspecto anómalo.

▼B

1.8.3. **Determinações analíticas**

O oxigénio dissolvido e o pH são determinados no início e no fim do ensaio, nas testemunhas e no tratamento com maior concentração de substância ensaiada. A concentração de oxigénio dissolvido nos recipientes dos grupos-testemunha deve estar em conformidade com o critério de validade (ver ponto 1.6). A variação do pH em cada ensaio não deve, normalmente, exceder 1,5 unidades. A temperatura é normalmente medida nos recipientes-testemunha ou no ar ambiente, devendo, de preferência, ser registada continuamente durante o ensaio ou, no mínimo, no início e no fim do mesmo.

A concentração de substância ensaiada deve ser medida, no mínimo, nos tratamentos com maior e menor concentração, no início e no fim do ensaio (4). Recomenda-se que os resultados se baseiem em concentrações medidas. No entanto, caso seja possível demonstrar que a concentração da substância a ensaiar na solução se manteve, durante o ensaio, no intervalo de ± 20 % do valor nominal ou do valor da concentração inicial medida, os resultados poderão basear-se em valores nominais ou nos valores iniciais medidos.

1.9. ENSAIO-LIMITE

Pode ser efectuado, utilizando os procedimentos descritos no presente método, um ensaio-limite com uma concentração de 100 mg/l da substância a ensaiar, ou até ao respectivo limite de solubilidade no meio de ensaio, se este for inferior, a fim de demonstrar que a CE_{50} é superior àquela concentração. O ensaio-limite deve ser efectuado com 20 dafnídeos (de preferência, divididos em quatro grupos de cinco), utilizando-se o mesmo número nos grupos-testemunha. Se houver alguma ocorrência de imobilização, deverá realizar-se um estudo completo. Qualquer comportamento anómalo deve ser registado.

2. **DADOS**

Os dados devem ser resumidos num quadro, indicando, para cada grupo de tratamento e cada grupo-testemunha, o número de dafnídeos usados e a imobilização em cada momento de observação. As percentagens de imobilizados registadas às 24 horas e às 48 horas são depois representadas num gráfico, em função das concentrações ensaiadas. Os dados são em seguida analisados por métodos estatísticos adequados (por exemplo, análise probit, etc.) para cálculo dos coeficientes angulares e da CE_{50}, com um intervalo de confiança de 95 % ($p = 0,05$) (7) (8).

Quando não sejam aplicáveis aos dados obtidos os métodos usuais de cálculo da CE_{50}, a maior concentração que não provoque imobilização e a menor concentração que provoque 100 % de imobilização devem ser usadas como valores aproximados para o cálculo da CE_{50}, que será considerada como sendo a média geométrica daquelas duas concentrações.

3. **RELATÓRIOS**

3.1. RELATÓRIO DO ENSAIO

O relatório do ensaio deve incluir o seguinte:

Substância ensaiada:

— natureza física e propriedades físico-químicas relevantes,

▼B

— dados relativos à identificação química, incluindo a pureza.

Espécie experimental:

— espécie de *Daphnia* utilizada e sua origem, fornecedor original (se for conhecido) e condições de cultura utilizadas (incluindo a origem, tipo e quantidade de alimentos e a frequência com que são fornecidos).

Condições experimentais:

— descrição dos recipientes de ensaio: tipo de recipiente, volume de solução, número de dafnídeos por recipiente, número de recipientes (repetições) por concentração,

— métodos de preparação das soluções-padrão e das soluções de ensaio, incluindo a utilização de solventes ou dispersantes, concentrações utilizadas,

— informações respeitantes à água de diluição: origem e parâmetros de qualidade (pH, dureza, razão Ca/Mg, razão Na/K, alcalinidade, condutividade, etc.); composição da água reconstituída, caso tenha sido utilizada,

— condições de incubação: temperatura, intensidade e periodicidade da iluminação, oxigénio dissolvido, pH, etc.

Resultados:

— número e percentagem de dafnídeos imobilizados ou nos quais foram detectados efeitos nocivos (incluindo anomalias de comportamento) nos grupos-testemunha e em cada um dos grupos tratados, em cada uma das observações efectuadas, bem como uma descrição da natureza dos efeitos observados,

— resultados e data do ensaio da substância de referência, caso existam,

— concentrações nominais ensaiadas e resultado de todas as análises efectuadas para determinação da concentração da substância ensaiada nos recipientes de ensaio; devem também ser indicados a eficiência de recuperação do método e o limite de determinação,

— todas as medições físico-químicas da temperatura, do pH e do oxigénio dissolvido efectuadas durante o ensaio,

— o valor da CE_{50} de imobilização às 48 h, com intervalos de confiança e gráficos do modelo ajustado utilizados no respectivo cálculo, os coeficientes angulares das linhas dose/resposta e respectivo desvio-padrão, os métodos estatísticos utilizados na determinação da CE_{50} (os mesmos dados devem também ser indicados para a imobilização às 24 h, se tiverem sido medidos),

— explicação dos eventuais desvios relativamente ao «Método de ensaio», e da medida em que afectaram os resultados do ensaio.

4. **REFERÊNCIAS**

(1) ISO 6341. (1996). Water quality — Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) — Acute toxicity test. Third edition, 1996.

(2) EPA OPPTS 850.1010. (1996). Ecological Effects Test Guidelines — Aquatic Invertebrate Acute Toxicity Test, Freshwater Daphnids.

▼B

(3) Environment Canada. (1996) Biological test method. Acute Lethality Test Using *Daphnia* spp. EPS 1/RM/11. Environment Canada, Ottawa, Ontario, Canada.

(4) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publication. Series on Testing and Assessment. No. 23. Paris, 2000.

(5) Commission of the European Communities. Study D8369. (1979). Inter-laboratory Test Programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to *Daphnia.*

(6) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 211: *Daphnia magna* Reproduction Test, adopted September 1998.

(7) Stephan C.E. (1977). Methods for calculating an LC_{50}. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelink). ASTM STP 634 — American Society for Testing and Materials. Pp 65-84

(8) Finney D.J. (1978). Statistical Methods in Biological Assay. 3rd ed. London. Griffin, Weycombe, UK.

▼B

Apêndice 1

ALGUMAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DE UMA ÁGUA DE DILUIÇÃO ACEITÁVEL

Substância	Concentração
Partículas em suspensão	< 20 mg/l
Carbono orgânico total	< 2 mg/l
Amoníaco (não ionizado)	< 1 µg/l
Cloro residual	< 10 µg/l
Total de pesticidas organofosforados	< 50 ng/l
Total de pesticidas organoclorados + bifenilos policlorados	< 50 ng/l
Cloro orgânico total	< 25 ng/l

▼B

Apêndice 2

EXEMPLOS DE ÁGUA RECONSTITUÍDA ADEQUADA PARA O ENSAIO

Água de ensaio ISO (1)

Soluções-padrão (uma só substância)		Para preparar a água reconstituída, juntar a 1 litro de água os seguintes volumes de soluções-padrão (*)
Substância	Quantidade adicionada a 1 litro de água (*)	
Cloreto de cálcio $CaCl_2\ 2H_2O$	11,76 g	25 ml
Sulfato de magnésio $MgSO_4\ 7H_2O$	4,93 g	25 ml
Bicarbonato de sódio $NaHCO_3$	2,59 g	25 ml
Cloreto de potássio KCl	0,23 g	25 ml

(*) Água de pureza adequada, por exemplo, desionizada, destilada ou tratada por osmose inversa, de preferência com condutividade não superior a 10 $\mu S.cm^{-1}$.

Meios Elendt M7 e M4

Aclimatação aos meios Elendt M4 e M7

Alguns laboratórios tiveram dificuldades na transferência directa de *Daphnia* para os meios M4 e M7. No entanto, obteve-se algum sucesso com uma aclimatação gradual, isto é, transferindo do meio próprio para meio Elendt a 30 %, a 60 % e, por fim, a 100 %. Os períodos de aclimatação necessários podem atingir um mês.

Preparação

Oligoelementos

Preparar separadamente soluções-padrão (I) de cada oligoelemento em água de pureza adequada, por exemplo, desionizada, destilada ou tratada por osmose inversa. Com estas soluções-padrão (I), preparar uma segunda solução-padrão única (II) contendo todos os oligoelementos (solução combinada), ou seja:

Solução(ões)-padrão I (uma só substância)	Quantidade adicionada à água (mg/l)	Concentração (em relação ao meio M4)	Para preparar a solução-padrão combinada II, juntar a seguinte quantidade de soluçãopadrão I à água (ml/l)	
			M4	M7
$H_3\ BO_3$	57 190	20 000 vezes	1,0	0,25
$MnCl_2\ 4H_2O$	7 210	20 000 vezes	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000 vezes	1,0	0,25

▼B

Solução(ões)-padrão I (uma só substância)	Quantidade adicionada à água (mg/l)	Concentração (em relação ao meio M4)	Para preparar a solução-padrão combinada II, juntar a seguinte quantidade de soluçãopadrão I à água (ml/l)	
			M4	M7
RbCl	1 420	20 000 vezes	1,0	0,25
$SrCl_2$ $6H_2O$	3 040	20 000 vezes	1,0	0,25
NaBr	320	20 000 vezes	1,0	0,25
Na_2 MoO_4 $2H_2O$	1 230	20 000 vezes	1,0	0,25
$CuCl_2$ $2H_2O$	335	20 000 vezes	1,0	0,25
$ZnCl_2$	260	20 000 vezes	1,0	1,0
$CoCl_2$ $6H_2O$	200	20 000 vezes	1,0	1,0
KI	65	20 000 vezes	1,0	1,0
Na_2 SeO_3	43,8	20 000 vezes	1,0	1,0
NH_4 VO_3	11,5	20 000 vezes	1,0	1,0
Na_2 EDTA $2H_2O$	5 000	2 000 vezes	—	—
$FeSO_4$ $7H_2O$	1 991	2 000 vezes	—	—

As soluções Na_2 EDTA e $FeSO_4$ são preparadas separadamente, depois vertidas no mesmo recipiente e imediatamente esterilizadas em autoclave,

obtendo-se assim:

21 de solução Fe-EDTA		1 000 vezes	20,0	5,0

Meios M4 e M7

Os meios M4 e M7 são preparados a partir da solução-padrão II, dos macronutrientes e das vitaminas, do seguinte modo:

	Quantidade adicionada à água (mg/l)	Concentração (em relação ao meio M4)	Quantidade de solução II adicionada para preparação do meio (ml/l)	
			M4	M7
Solução-padrão II (combinação de oligoelementos)		20 vezes	50	50
Soluções-padrão de macronutrientes (uma só substância)				
$CaCl_2$ • $2H_20$	293 800	1 000 vezes	1,0	1,0
$MgSO_4$ • $7H_2O$	246 600	2 000 vezes	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000 vezes	0,1	0,1
$NaHCO_3$	64 800	1 000 vezes	1,0	1,0
Na_2 SiO_3 • $9H_2O$	50 000	5 000 vezes	0,2	0,2
$NaNO_3$	2 740	10 000 vezes	0,1	0,1
KH_2 PO_4	1 430	10 000 vezes	0,1	0,1
K_2HPO_4	1 840	10 000 vezes	0,1	0,1

▼B

	Quantidade adicionada à água (mg/l)	Concentração (em relação ao meio M4)	Quantidade de solução II adicionada para preparação do meio (ml/l)	
			M4	M7
Solução-padrão de vitaminas	—	10 000 vezes	0,1	0,1
A solução-padrão de vitaminas prepara-se juntando as três vitaminas a 1 litro de água conforme indicado a seguir:				
Cloridrato de tiamina	750	10 000 vezes		
Cianocobalamina (B_{12})	10	10 000 vezes		
Biotina	7,5	10 000 vezes		

A solução-padrão de vitaminas é armazenada e congelada em pequenas alíquotas. As vitaminas são adicionadas ao meio imediatamente antes da utilização.

N.B.: Para evitar a precipitação dos sais quando se prepara o meio completo, adicionar as alíquotas de soluções de reserva a cerca de 500-800 ml de água desionizada e perfazer até 1 l.

N.B: A primeira publicação relativa ao meio M4 tem a seguinte referência: Elendt, B. P. (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructual approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154, 25-33.

▼M6

C.3. ALGAS E CIANOBACTÉRIAS DE ÁGUA DOCE — ENSAIO DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO

INTRODUÇÃO

1. O presente método é equivalente ao *Test Guideline* TG 201 (2006, anexo corrigido em 2011) da OCDE. Verificou-se a necessidade de alargar o método de ensaio, a fim de incluir mais espécies, e de o atualizar de forma a satisfazer os requisitos de avaliação dos perigos e de classificação dos produtos químicos. A revisão foi concluída com base numa extensa experiência prática, nos progressos científicos no domínio dos estudos de toxicidade com algas e na extensa utilização no domínio regulamentar desde a adoção do método original.

2. Os conceitos utilizados são definidos no apêndice.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

3. O objetivo do presente ensaio consiste em determinar os efeitos de um produto químico no crescimento de cianobactérias e/ou algas de água doce. Os organismos de ensaio em fase de crescimento exponencial são expostos ao produto químico em estudo em culturas em meio líquido, normalmente durante 72 horas. Apesar da duração relativamente curta do ensaio, podem avaliar-se os efeitos ao longo de várias gerações.

4. A resposta do sistema consiste na redução do crescimento numa série de culturas de algas (unidades de ensaio) expostas a diferentes concentrações do produto químico em estudo. Essa resposta é avaliada em função da concentração de exposição, por comparação com o crescimento médio de culturas de controlo replicadas não expostas ao produto químico em estudo. A fim de obter uma caracterização total da resposta do sistema aos efeitos tóxicos (otimização da sensibilidade), permite-se o crescimento exponencial não limitado das culturas, com uma quantidade suficiente de nutrientes e em condições de iluminação constante, durante um período suficiente para que se possa medir a redução da taxa de crescimento específica.

5. O crescimento, bem como a sua inibição, é quantificado através da medição da biomassa das algas ao longo do tempo. A biomassa das algas é definida como o peso seco por unidade de volume: por exemplo, mg de algas/litro de solução de ensaio. A determinação do peso seco é, contudo, difícil, pelo que se utilizam parâmetros alternativos, o mais utilizado dos quais é a contagem de células. Outros parâmetros alternativos incluem o volume de células, a fluorescência, a densidade ótica, etc. Deve ser conhecido um fator de conversão entre o parâmetro alternativo medido e a biomassa.

6. O ponto final do ensaio ocorre quando se dá inibição do crescimento, expresso como o aumento logarítmico da biomassa (taxa média de crescimento específico) durante o período de exposição. A partir das taxas médias de crescimento específico registadas numa série de soluções de ensaio, a concentração que causa uma inibição da taxa de crescimento de x % (por exemplo: 50 %) é determinada e expressa como E_rC_x (nesse caso, E_rC_{50}).

7. Uma variável de resposta adicional utilizada no presente método de ensaio é o rendimento, que pode ser necessário para dar cumprimento a exigências regulamentares específicas de alguns países. Esta variável é definida como a diferença entre a biomassa no final e no início do período de exposição. A partir dos rendimentos registados numa série de soluções de ensaio, a concentração que causa uma inibição do rendimento de x % (por exemplo: 50 %) é determinada e expressa como E_yC_x (nesse caso, E_yC_{50}).

8. Por outro lado, a menor concentração com efeito observável (LOEC) e a concentração sem efeitos observáveis (NOEC) podem ser determinadas estatisticamente.

▼M6

INFORMAÇÕES SOBRE O PRODUTO QUÍMICO EM ESTUDO

9. As informações sobre o produto químico em estudo que podem ser úteis para estabelecer as condições do ensaio incluem a fórmula estrutural, a pureza, a estabilidade à luz, a estabilidade nas condições de ensaio, as propriedades de absorção da luz, o pKa e os resultados dos estudos de transformação, incluindo a biodegradabilidade na água.

10. A hidrossolubilidade, o coeficiente de partição octanol/água (P_{ow}) e a pressão de vapor do produto químico em estudo devem ser conhecidos, devendo estar disponível um método validado para a quantificação do produto químico nas soluções de ensaio com uma eficiência de recuperação e um limite de deteção conhecidos.

VALIDADE DOS ENSAIOS

11. Um ensaio é considerado válido quando satisfaz os seguintes critérios de desempenho:

— A biomassa das culturas de controlo deve ter aumentado exponencialmente num fator de, pelo menos, 16 durante as 72 horas do período de ensaio. Este valor corresponde a uma taxa de crescimento específica de 0,92 dia^{-1}. Em geral, a taxa de crescimento das espécies mais frequentemente utilizadas é muito mais elevada (ver apêndice 2). Este critério não poderá ser cumprido quando se utilizarem espécies de crescimento mais lento do que as espécies que constam do apêndice 2. Nesses casos, o período de ensaio deve ser alargado para permitir um fator de crescimento mínimo de 16 nas culturas de controlo, devendo esse crescimento ser exponencial durante todo o período de ensaio. O período de ensaio pode ser reduzido até ao mínimo de 48 horas, de modo a manter um crescimento exponencial não limitado durante todo o período de ensaio, desde que o fator mínimo de multiplicação por 16 seja atingido.

— O coeficiente médio de variação das taxas de crescimento específico em cada secção do ensaio (dias 0-1, 1-2 e 2-3, no caso dos ensaios de 72 horas) nas culturas de controlo (ver no apêndice 1 a definição de «coeficiente de variação») não deve exceder 35 %. No que respeita ao cálculo das taxas de crescimento específico em cada secção do ensaio, ver ponto 49. Este critério é aplicável ao valor médio dos coeficientes de variação calculados para os replicados das culturas de controlo.

— O coeficiente de variação das taxas médias de crescimento específico dos replicados das culturas de ensaio, durante todo o período de ensaio, não deve exceder 7 % nos ensaios com *Pseudokirchneriella subcapitata* e com *Desmodesmus subspicatus*. No caso de outras espécies menos utilizadas, não deve exceder 10 %.

PRODUTOS QUÍMICOS DE REFERÊNCIA

12. Para verificação do procedimento de ensaio, podem ser ensaiados um ou mais produtos químicos de referência, como, por exemplo, o 3,5-diclorofenol, que é utilizado no estudo interlaboratorial comparativo (1). O dicromato de potássio pode também ser utilizado como produto químico de referência para as algas verdes. É desejável proceder ao ensaio de um produto químico de referência pelo menos duas vezes por ano.

APLICABILIDADE DO ENSAIO

13. O presente método de ensaio é de aplicação mais fácil para produtos químicos hidrossolúveis que, nas condições de ensaio, permaneçam dissolvidos na água. Para o ensaio de produtos químicos voláteis, fortemente adsorventes, corados, com baixa hidrossolubilidade ou que possam afetar a disponibilidade

▼M6

de nutrientes ou de minerais no meio de ensaio, poderão ser necessárias alterações do procedimento descrito (por exemplo: utilização de sistemas fechados, condicionamento dos recipientes de ensaio). Para mais orientações sobre algumas alterações adequadas, consultar as referências bibliográficas (2) (3) (4).

DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

Material e aparelhagem

14. Os recipientes de ensaio e outros aparelhos que entrem em contacto com as soluções de ensaio devem ser, exclusivamente, de vidro ou de outro material quimicamente inerte. Todo o material deve ser cuidadosamente lavado, de forma a garantir que nenhum contaminante orgânico ou inorgânico possa interferir com o crescimento das algas ou com a composição das soluções de ensaio.

15. Os recipientes de ensaio serão normalmente frascos de vidro dimensionados de forma a permitir a recolha dos volumes de cultura necessários para as medições ao longo do ensaio e a garantir uma superfície de contacto suficiente para a permuta de CO_2 com a atmosfera (ver ponto 30). De notar que o volume de líquido deve ser suficiente para as determinações analíticas necessárias (ver ponto 37).

16. Adicionalmente, serão necessários, total ou parcialmente, os seguintes equipamentos:

— Aparelho de cultura: recomenda-se a utilização de um armário ou câmara onde a temperatura de incubação escolhida possa ser mantida com uma precisão de ± 2 °C.

— Instrumentos de medição da luz: é importante notar que o método escolhido para a medição da intensidade luminosa e, em especial, o tipo de recetor (coletor) poderá influenciar o valor medido. As medições devem ser feitas, de preferência, utilizando um recetor esférico (4π, que responda à luz direta e à luz refletida a partir de todos os ângulos acima e abaixo do plano de medição) ou um recetor 2π (que responda à luz proveniente de todos os ângulos acima do plano de medição).

— Aparelho para determinação da biomassa das algas: a contagem de células, que é o parâmetro alternativo mais frequentemente utilizado para a biomassa das algas, pode ser feita utilizando um contador eletrónico de partículas, um microscópio com câmara de contagem ou um citómetro de fluxo. Outros métodos alternativos possíveis são a medição com um citómetro de massa, com um fluorímetro, com um espetrofotómetro ou com um colorímetro. É conveniente calcular um fator de conversão que relacione a contagem de células com o peso seco. A fim de conseguir medições úteis para as baixas concentrações de biomassa, quando se recorre a um espetrofotómetro pode ser necessário utilizar células com um percurso ótico mínimo de 4 cm.

Organismos sujeitos aos ensaios

17. Podem ser utilizadas diversas espécies de cianobactérias e de microalgas de água livre. Comprovou-se que as estirpes constantes da lista do apêndice 2 são apropriadas para utilização no procedimento especificado no presente método de ensaio.

18. Se forem utilizadas outras espécies, deve ser comunicada a respetiva estirpe e/ou origem. Importa confirmar que o crescimento exponencial das algas selecionadas para o ensaio pode ser mantido ao longo de todo o período de ensaio, nas condições vigentes.

Meio de cultura

19. São recomendados dois meios de cultura alternativos — o meio OCDE e o meio AAP, cujas composições são apresentadas no apêndice 3. De notar que o valor inicial de pH e a capacidade tampão (regulação do aumento do pH) dos dois meios são diferentes. Assim, os resultados dos ensaios poderão ser diferentes em função do meio utilizado, em especial quando estiverem em estudo produtos químicos ionizantes.

▼M6

20. Pode ser necessário modificar o meio de cultura para determinados efeitos, como, por exemplo, quando se pretender proceder ao ensaio de metais ou de agentes quelantes ou a ensaios a diferentes valores de pH. A utilização de um meio modificado deve ser descrita em pormenor e justificada (3) (4).

Concentração inicial de biomassa

21. A biomassa inicial das culturas de ensaio deve ser a mesma em todas as culturas e suficientemente baixa para permitir um crescimento exponencial ao longo de todo o período de incubação, sem risco de esgotamento dos nutrientes. A biomassa inicial não deve ser superior a 0,5 mg/l (peso seco). Recomendam-se as seguintes concentrações iniciais de células:

Pseudokirchneriella subcapitata:	5 x 10^3 — 10^4 células/ml
Desmodesmus subspicatus	2-5 x 10^3 células/ml
Navicula pelliculosa	10^4 células/ml
Anabaena flos-aquae	10^4 células/ml
Synechococcus leopoliensis	5 x 10^4 — 10^5 células/ml

Concentrações do produto químico em estudo

22. A gama de concentrações na qual é provável a ocorrência de efeitos pode ser determinada com base nos resultados de ensaios de determinação da gama de concentrações a utilizar. Para o ensaio final e definitivo, devem ser selecionadas pelo menos cinco concentrações, organizadas numa progressão geométrica com um fator que não exceda 3,2. No caso de produtos químicos em estudo que exibam uma curva invariável de resposta à concentração, poderá justificar-se um fator mais elevado. As séries de concentrações devem, de preferência, abranger uma gama que cause uma inibição de 5-75 % da taxa de crescimento das algas.

Replicados e controlos

23. O ensaio deve ser executado com três replicados de cada concentração em estudo. Caso não seja necessário determinar a NOEC, o ensaio pode ser alterado de modo a aumentar o número de concentrações estudadas, reduzindo o número de replicados por concentração. O controlo deve ter, no mínimo, três replicados, e o ideal será utilizar para o controlo o dobro do número de replicados utilizados para cada concentração estudada.

24. Pode preparar-se um conjunto separado de soluções de ensaio para as determinações analíticas das concentrações do produto químico em estudo (ver pontos 36 e 38).

25. Se se utilizar um solvente para solubilizar o produto químico em estudo, o ensaio deve incluir controlos adicionais que contenham esse solvente à mesma concentração usada nas culturas de ensaio.

Preparação da cultura de inóculo

26. Para adaptar as algas às condições de ensaio e garantir que se encontram na fase de crescimento exponencial quando são utilizadas para inocular as soluções em estudo, prepara-se uma cultura de inóculo, em meio de ensaio, 2 a 4 dias antes do início do ensaio. A biomassa de algas deve ser ajustada de modo a permitir que o inóculo se mantenha em crescimento exponencial até ao início do ensaio. Incubar a cultura do inóculo nas mesmas condições que as culturas de ensaio. Determinar o aumento da biomassa da cultura de inóculo, para garantir que o seu crescimento se encontra dentro dos padrões

▼M6

normais para a estirpe de ensaio, nas condições de cultura. O apêndice 4 apresenta um exemplo do procedimento a utilizar para a cultura de algas. Para evitar divisões celulares sincronizadas durante o ensaio, poderá ser necessário executar um segundo passo de propagação da cultura de inóculo.

Preparação das soluções de ensaio

27. Todas as soluções de ensaio devem conter a mesma concentração de meio de cultura e a mesma biomassa inicial de algas de ensaio. As soluções de ensaio às concentrações escolhidas são normalmente preparadas misturando uma solução de reserva do produto químico em estudo com o meio de cultura e com a cultura de inóculo. As soluções de reserva são normalmente preparadas por dissolução do produto químico no meio de ensaio.

28. Nos casos em que se pretenda adicionar ao meio de ensaio produtos químicos pouco hidrossolúveis, podem ser utilizados solventes como a acetona, o álcool *t*-butílico ou a dimetilformamida (2) (3). A concentração de solvente, que deve ser acrescentado a todas as culturas do ensaio (incluindo as de controlo) à mesma concentração, não deve exceder 100 µl/l.

Incubação

29. Tapar os frascos de ensaio com rolhas permeáveis ao ar. Os frascos são agitados e colocados no aparelho de incubação. Durante o ensaio, é necessário manter as algas em suspensão e facilitar as transferências de CO_2. Para tal, deve utilizar-se uma agitação ou um movimento constante. As culturas devem ser mantidas a uma temperatura compreendida entre 21 e 24 °C, controlada a ± 2 °C. Se forem utilizadas espécies diferentes das que constam da lista do apêndice 2 (por exemplo, espécies tropicais), poderá ser necessário utilizar temperaturas mais elevadas, desde que se verifiquem os critérios de validade. Recomenda-se colocar os frascos na incubadora de forma aleatória e mudar diariamente a sua posição.

30. O pH do meio de controlo não deve aumentar mais de 1,5 unidades durante o ensaio. No caso dos metais e de produtos químicos que se ionizam parcialmente a um pH próximo do pH do ensaio, poderá ser necessário limitar a variação do pH, a fim de obter resultados reprodutíveis e bem definidos. Uma variação inferior a 0,5 unidades de pH é tecnicamente realizável e pode ser conseguida se se garantir uma taxa de transferência mássica de CO_2 da atmosfera para a solução de ensaio (por exemplo, aumentando a agitação). Outra possibilidade passa pela redução das necessidades de CO_2, diminuindo a biomassa inicial ou a duração do ensaio.

31. A superfície em que as culturas são incubadas deve receber uma iluminação fluorescente contínua e uniforme, do tipo «branco-frio» ou «luz do dia». As diferentes estirpes de algas e cianobactérias têm necessidades diferentes em termos de luz. A intensidade da luz deve, portanto, ser adaptada ao organismo utilizado no ensaio. Para as espécies recomendadas de algas verdes, selecionar a intensidade da luz ao nível da solução de ensaio na gama dos 60-120 $\mu E \cdot m^{-2}\ s^{-1}$, medidos na gama de comprimentos de onda necessária para a fotossíntese, entre 400 e 700 nm, utilizando um recetor adequado. Algumas espécies, em especial a *Anabaena flos-aquae*, exibem bom crescimento com menor intensidade luminosa, podendo mesmo ser prejudicadas por uma luz demasiado intensa. Para essas espécies, deve ser utilizada uma intensidade luminosa média na gama 40-60 $\mu Em^{-2} \cdot s^{-1}$ (no caso dos instrumentos de medição da luz calibrados em lux, uma gama equivalente a 4 440-8 880 lux para a luz branca corresponde aproximadamente à intensidade luminosa recomendada de 60 - 120 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$). Manter a intensidade luminosa num intervalo de ±15 % em relação à intensidade média sobre a zona de incubação.

▼M6

Duração do ensaio

32. A duração normal dos ensaios é de 72 horas. No entanto, podem ser efetuados ensaios de maior ou menor duração, desde que se verifiquem todos os critérios de validade referidos no ponto 11.

Medições e determinações analíticas

33. A biomassa de algas em cada frasco é determinada pelo menos uma vez por dia, ao longo do período de ensaio. Se as medições forem efetuadas em pequenos volumes retirados da solução de ensaio por meio de pipeta, esses volumes não devem ser repostos.

34. A medição da biomassa é efetuada por contagem manual de células num microscópio ou num contador eletrónico de partículas (contagem de células e/ou biovolume). Podem ser utilizadas técnicas alternativas, como a citometria de fluxo, a fluorescência clorofílica *in vitro* ou *in vivo* (5) (6) ou a densidade ótica, desde que se possa demonstrar uma boa correlação com a biomassa ao longo de toda a gama de concentrações de biomassa prevista durante o ensaio.

35. O pH das soluções é medido no início e no final do ensaio.

36. Desde que exista um procedimento analítico para a determinação do produto químico em estudo na gama de concentrações utilizada, as soluções de ensaio devem ser analisadas para verificar a concentração inicial e a manutenção da concentração de exposição ao longo do ensaio.

37. A análise da concentração do produto químico em estudo no início e no final do ensaio, para as concentrações de ensaio mais elevadas e mais baixas e para uma concentração próxima da EC_{50} previsto, poderá ser suficiente se não se esperar uma variação das concentrações de exposição superior a 20 % em relação ao respetivo valor nominal ao longo do ensaio. Nos casos em que seja improvável que as concentrações se mantenham no intervalo de 80-120 % da concentração nominal, recomenda-se a análise de todas as concentrações de ensaio no início e no final do ensaio. No caso de produtos químicos voláteis, instáveis ou fortemente adsorventes, recomenda-se a realização de amostragens suplementares para análise a intervalos de 24 horas durante o período de exposição, de modo a caracterizar melhor a redução da concentração do produto químico em estudo. Para esses produtos químicos, pode ser necessário utilizar um número maior de replicados. Em qualquer dos casos, a determinação das concentrações do produto químico em estudo só é necessária num dos frascos replicados para cada concentração de ensaio (ou no conteúdo misturado de todos os frascos replicados).

38. O meio de ensaio preparado especificamente para a análise das concentrações de exposição durante o ensaio deve ser tratado da mesma forma que o utilizado no ensaio, ou seja, deve ser inoculado com algas e incubado em condições idênticas. Se for necessário analisar a concentração do produto químico dissolvido, as algas poderão ter de ser separadas do meio de cultura. Essa separação deve, de preferência, ser feita por centrifugação a baixa velocidade, suficiente para garantir a deposição das algas.

39. Se houver provas de que, durante o ensaio, a concentração do produto químico em estudo não variou mais de 20 % em relação ao valor da concentração nominal ou da concentração inicial medida, a análise dos resultados pode basear-se nos valores nominais ou iniciais medidos. Se a variação em relação à concentração nominal ou à concentração inicial medida não se situar na gama de ± 20 %, a análise dos resultados deve basear-se na média geométrica da concentração durante a exposição ou em modelos que descrevam a diminuição da concentração do produto químico em estudo (3) (7).

▼M6

40. O ensaio de inibição de crescimento de algas representa um sistema de ensaio mais dinâmico do que a maior parte dos outros tipos de ensaio de toxicidade a curto prazo em meio aquático. Por isso, as concentrações reais de exposição poderão ser difíceis de determinar, especialmente para os produtos químicos mais adsorventes e ensaiados a concentrações mais baixas. Nesses casos, o desaparecimento do produto químico da solução, por adsorção à cada vez maior biomassa de algas, não significa que o produto tenha desaparecido do sistema de ensaio. Quando os resultados do ensaio forem analisados, deve verificar-se se a diminuição da concentração do produto químico ao longo do ensaio é ou não acompanhada de uma quebra da inibição do crescimento. Se tal suceder, poderá ponderar-se a possibilidade de utilizar um modelo que descreva a diminuição da concentração do produto químico em estudo (7). No caso contrário, o melhor poderá ser basear a análise dos resultados nas concentrações iniciais (nominais ou medidas).

Outras observações

41. O inóculo deve ser observado ao microscópio, para verificar se a cultura apresenta um aspeto normal e saudável e para verificar se o aspeto das algas exibe alguma anormalidade que possa ser causada pela exposição ao produto químico em estudo, no final do ensaio.

Ensaio do limite

42. Em determinadas circunstâncias (por exemplo, se um ensaio preliminar indicar que o produto químico em estudo não apresenta efeitos tóxicos em concentrações até 100 mg/l ou até ao seu limite de solubilidade no meio de ensaio, conforme o que seja menor), pode proceder-se a um ensaio do limite, com comparação das respostas de um grupo de controlo e de um grupo exposto ao produto químico em estudo (a uma concentração de 100 mg/l ou que corresponda ao limite de solubilidade). Recomenda-se vivamente que a ausência de toxicidade seja confirmada por análise da concentração de exposição. Todas as condições de ensaio e critérios de validade anteriormente descritos são aplicáveis aos ensaios do limite, com exceção da necessidade de utilizar, no mínimo, seis replicados dos frascos expostos ao produto químico. As variáveis de resposta dos grupos de controlo e de exposição podem ser analisadas através de um ensaio estatístico de comparação das médias, como, por exemplo, o teste t de Student. Caso as variâncias dos dois grupos sejam diferentes, deve ser realizado um teste t de Student ajustado para diferenças das variâncias.

DADOS E RELATÓRIOS

Traçado das curvas de crescimento

43. A biomassa dos frascos de ensaio pode ser expressa nas unidades do parâmetro alternativo utilizado para as medições (por exemplo: número de células, fluorescência).

44. Criar tabelas com a concentração estimada da biomassa das culturas de ensaio e dos controlos, em função das concentrações do material em estudo e do momento da amostragem, arredondado às horas, de modo a produzir graficamente as curvas de crescimento. Numa primeira fase poderá ser útil utilizar tanto a escala geométrica como a logarítmica, mas a segunda é obrigatória e resulta geralmente numa melhor representação das variações do padrão de crescimento durante o período de ensaio. De notar que o crescimento exponencial, quando apresentado em escala logarítmica, resulta numa reta cuja inclinação (declive) indica a taxa de crescimento específico.

45. Utilizando os gráficos, verificar se as culturas de controlo cresceram exponencialmente à taxa prevista ao longo de todo o ensaio. Fazer uma análise crítica de todos os pontos e do aspeto global dos gráficos e verificar os dados brutos e os procedimentos aplicados, a fim de detetar eventuais erros. Verificar, em particular, qualquer ponto que pareça afetado por erros sistemáticos. Se a identificação dos erros de procedimento for óbvia e/ou a probabilidade de ocorrência desses erros for elevada, os dados específicos

▼M6

em causa são considerados aberrantes e não se incluem na análise estatística subsequente (uma concentração de algas igual a zero num em cada dois ou três replicados pode indicar que o recipiente não foi corretamente inoculado ou devidamente limpo). Os motivos para a rejeição de um ponto considerado aberrante devem ser claramente indicados no relatório de ensaio. Os motivos aceites são exclusivamente os (raros) erros de procedimento e não a simples falta de precisão. Os procedimentos estatísticos para a identificação dos pontos aberrantes apresentam uma utilidade limitada para este tipo de problemas, não substituindo a opinião avalizada de um perito. Os pontos aberrantes (assinalados como tal) devem, de preferência, ser conservados para eventual apresentação posterior em gráfico ou tabela.

Variáveis de resposta:

46. O objetivo do ensaio consiste em determinar os efeitos do produto químico em estudo no crescimento das algas. O presente método de ensaio descreve duas variáveis de resposta, já que as várias jurisdições têm diferentes preferências e necessidades regulamentares. Para que os resultados dos ensaios possam ser aceitáveis em todas as jurisdições, os efeitos têm de ser avaliados por recurso a ambas as variáveis de resposta, a) e b), a seguir descritas:

a) Taxa média de crescimento específico: esta variável é calculada com base no aumento logarítmico diário da biomassa durante o período de ensaio.

b) Rendimento: esta variável de resposta é a diferença entre a biomassa no final e no início do ensaio.

47. Cabe aqui notar que os valores de toxicidade calculados através destas duas variáveis de resposta não são comparáveis e que essa diferença tem de ser reconhecida para efeitos da utilização dos resultados do ensaio. Os valores de EC_x baseados na taxa média de crescimento específico (E_rC_x) são geralmente mais elevados do que os resultados baseados no rendimento (E_yC_x), se forem seguidas as condições de ensaio apresentadas no presente método de ensaio, devido à base matemática das respetivas abordagens. Este facto não deve ser interpretado como uma diferença de sensibilidade entre as duas variáveis de resposta, mas simplesmente como uma diferença matemática entre os valores. O conceito de taxa média de crescimento específico baseia-se no padrão geral de crescimento exponencial das algas em culturas não sujeitas a limitações, sendo a toxicidade estimada com base nos efeitos sobre a taxa de crescimento, e não depende do valor absoluto da taxa de crescimento específico dos controlos, do declive da curva de concentração--resposta ou da duração do ensaio. Em contrapartida, os resultados baseados no rendimento enquanto variável de resposta dependem de todas essas variáveis. O valor de E_yC_x depende da taxa de crescimento específico da espécie de algas utilizada em cada ensaio e da taxa máxima de crescimento específico, que pode ser diferente para as diferentes espécies ou mesmo para as diferentes estirpes de algas. Esta variável de resposta não deve ser utilizada para comparar a sensibilidade das diferentes espécies ou mesmo das diferentes estirpes de algas aos produtos tóxicos. Embora, do ponto de vista científico, seja preferível utilizar a taxa média de crescimento específico para a estimação da toxicidade, as estimativas da toxicidade com base no rendimento foram também incluídas no presente método de ensaio para satisfazer as atuais exigências regulamentares de alguns países.

Taxa média de crescimento

48. A taxa média de crescimento específico num determinado período é calculada como o aumento logarítmico da biomassa em cada um dos frascos de controlo e de ensaio, a partir da seguinte equação [1]:

▼M6

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i} (\text{dia}^{-1}) \qquad [1],$$

em que:

μ_{i-j} representa a taxa média de crescimento específico entre o momento *i* e o momento *j*;

X_i representa a biomassa no momento *i*;

X_j representa a biomassa no momento *j*.

Para cada um dos grupos de exposição e de controlo, calcular um valor médio da taxa de crescimento, associado às respetivas estimativas da variância.

49. Calcular a taxa média de crescimento específico ao longo de todo o ensaio (normalmente nos dias 0-3), utilizando o valor nominal da biomassa inoculada como valor inicial, de preferência à utilização de um valor medido nesse momento, já que assim se consegue geralmente uma precisão mais elevada. Se o equipamento utilizado para a medição da biomassa permitir uma determinação suficientemente precisa dos níveis reduzidos de biomassa presentes após a inoculação (por exemplo: citómetro de fluxo), pode utilizar-se o valor medido de concentração inicial da biomassa. Verificar igualmente as taxas de crescimento em cada secção do ensaio, calculadas como as taxas de crescimento específico em cada dia do ensaio (dias 0-1, 1--2 e 2-3), averiguando se a taxa de crescimento dos controlos se mantém constante (ver critérios de validade, ponto 11). Uma taxa de crescimento específico que, no primeiro dia, seja significativamente inferior à taxa média de crescimento específico da totalidade do ensaio pode indicar uma fase de latência. Embora a fase de latência possa ser minimizada ou mesmo praticamente eliminada nas culturas de controlo através de uma propagação adequada da cultura de arranque, essa fase de latência nas culturas expostas ao produto químico em estudo pode indicar uma recuperação após a fase inicial de *stress* por toxicidade ou uma menor exposição ao produto químico em estudo devido ao seu desaparecimento (incluindo a eventual adsorção à biomassa das algas) após a exposição inicial. Assim, pode avaliar-se a taxa de crescimento em cada secção do ensaio para verificar os efeitos do produto químico em estudo durante o período de exposição. A existência de diferenças substanciais entre as taxas de crescimento de cada secção do ensaio e a taxa média de crescimento indica um desvio relativamente à situação de crescimento exponencial constante, exigindo portanto uma análise mais pormenorizada das curvas de crescimento.

50. Calcula-se a inibição percentual da taxa de crescimento para cada um dos replicados expostos utilizando a seguinte equação [2]:

$$\%I_r = \frac{\mu_C - \mu_T}{\mu_C} \times 100 \qquad [2],$$

em que:

$\%I_r$ = inibição percentual da taxa média de crescimento específico;

μ_C = valor médio das taxas médias de crescimento específico (μ) no grupo de controlo;

μ_T = taxa média de crescimento específico dos replicados do grupo exposto.

51. Se forem utilizados solventes na preparação das soluções de ensaio, devem utilizar-se para o cálculo da inibição percentual os controlos com adição de solvente, em vez dos controlos apenas do meio de cultura.

Rendimento

52. O rendimento é calculado como a diferença entre a biomassa no final do ensaio e a biomassa inicial, em cada um dos frascos de controlo e de exposição. Para cada concentração de ensaio e cada controlo, calcular um valor médio de rendimento, associado às respetivas estimativas da variância. Para cada replicado exposto, a inibição percentual do rendimento ($\%I_y$) pode ser calculada do seguinte modo:

▼M6

$$\%I_y = \frac{(Y_c - Y_T)}{Y_c} \times 100 \qquad [3]$$

em que:

$\%\ I_y$ = inibição percentual do rendimento;

Y_C = valor médio do rendimento no grupo de controlo;

Y_T = valor do rendimento para os replicados expostos.

Traçado da curva de resposta à concentração

53. Traçar o gráfico da inibição percentual em função do logaritmo da concentração do produto químico em estudo e analisar o gráfico cuidadosamente, não tomando em conta os pontos identificados como aberrantes na primeira fase. Ajustar uma curva aproximada aos pontos experimentais, à vista ou por interpolação computorizada, de modo a obter uma primeira impressão da relação de resposta à concentração, após o que se deverá proceder ao traçado de uma curva mais exata, de preferência utilizando métodos estatísticos computorizados. Consoante a utilização que se pretenda dar aos dados, a qualidade (precisão) e a quantidade de dados, bem como a disponibilidade de ferramentas de análise dos mesmos, poderá decidir-se (por vezes, justificadamente) não prosseguir a análise dos dados nesta fase e limitar as leituras à determinação dos valores-chave EC_{50} e EC_{10} (e/ou EC_{20}) a partir da curva ajustada à vista (ver também o ponto seguinte, no respeitante aos efeitos de estimulação). Entre as razões válidas para não utilizar um método estatístico podem referir-se as seguintes:

— Os dados não permitem obter, por um método computorizado, resultados mais fiáveis do que por opinião avalizada — nessas situações, alguns programas informáticos podem mesmo ser incapazes de apresentar qualquer solução fiável (iterações divergentes, etc.);

— As respostas à estimulação do crescimento não são bem descritas pelos programas informáticos disponíveis (ver abaixo).

Processo estatístico

54. O objetivo consiste em descrever de forma quantitativa, por análise de regressão, a relação concentração-resposta. Pode utilizar-se uma regressão linear ponderada, antecedida de uma transformação de linearização dos dados de resposta — por exemplo, para unidades probit, logit ou de Weibull (8) — mas a técnica preferida é o recurso a procedimentos de regressão não linear, que permitem lidar melhor com as inevitáveis irregularidades dos dados e com os desvios relativamente a uma boa distribuição. Nas zonas próximas da inibição nula ou total, essas irregularidades podem mesmo ser reforçadas pela transformação, o que irá interferir com a análise (8). Cabe aqui notar que os métodos-padrão de análise que utilizam os transformados probit, logit ou Weibull se destinam à análise de dados quantais (por exemplo: mortalidade e sobrevivência), pelo que têm de ser alterados para adaptação a dados de crescimento ou de biomassa. Podem consultar-se em (9) (10) (11) alguns métodos para a determinação dos valores de EC_x a partir de dados contínuos. A utilização da análise de regressão não linear é apresentada com mais pormenor no apêndice 5.

55. Para cada uma das variáveis de resposta em análise, utilizar a relação concentração-resposta para estimar os valores pontuais de EC_x. Sempre que possível, devem determinar-se os limites de confiança a 95 % para cada estimativa. A adequação do ajustamento da curva estimada pelo modelo de regressão aos dados de resposta deve ser avaliada, graficamente ou por métodos estatísticos. A análise de regressão deve utilizar os valores de cada replicado e não o valor médio para cada grupo exposto. No entanto, se

▼M6

o ajustamento de um gráfico não linear se revelar difícil ou não for possível devido à grande dispersão dos dados, o problema poderá ser contornado pela aplicação da regressão aos valores médios de cada grupo, como forma prática de reduzir a influência dos pontos que sejam, provavelmente, aberrantes. A utilização desse método deve ser referida no relatório de ensaio como desvio em relação ao procedimento normal, por não ter sido possível ajustar uma curva aos valores individuais de todos os replicados com bons resultados.

56. Se os modelos/métodos de regressão disponíveis não forem aplicáveis aos dados existentes, as estimativas da EC_{50} e os respetivos intervalos de confiança podem também ser obtidos utilizando uma interpolação linear com *bootstrapping* (13).

57. Para a estimativa da LOEC e, consequentemente, da NOEC, bem como dos efeitos do produto químico em estudo na taxa de crescimento, é necessário analisar as médias dos frascos expostos utilizando técnicas de análise da variância (ANOVA). A média para cada concentração deve então ser comparada com a média observada nos controlos, utilizando um método adequado de comparação múltipla ou de análise de tendências. Os testes de Dunnett ou de Williams (12) (14) (15) (16) (17) podem ser úteis para este efeito. É necessário verificar se se cumpre o pressuposto de homogeneidade da variância das análises ANOVA. Essa verificação pode ser realizada graficamente ou por um teste formal (17). Os testes de Levene ou de Bartlett são adequados neste contexto. O problema colocado pelo incumprimento do pressuposto de homogeneidade das variâncias pode, por vezes, ser corrigido através da transformação logarítmica dos dados. Caso a heterogeneidade das variâncias seja extrema e não possa ser corrigida por transformação, deve ponderar-se a possibilidade de utilizar métodos de análise das tendências como, por exemplo, o método degressivo de Jonkheere. Para mais orientações sobre a determinação da NOEC, consultar a referência (11).

58. Os dados científicos mais recentes recomendam o abandono do conceito de NOEC, que deve ser substituído pela estimativa dos valores de EC_x por regressão. No caso do presente ensaio com algas, não foi definido nenhum valor x ideal. A gama de 10 % a 20 % afigura-se adequada (em função da variável de resposta escolhida), devendo ser comunicados, de preferência, tanto os valores de EC_{10} como de EC_{20}.

Estimulação do crescimento

59. Por vezes, pode observar-se uma estimulação do crescimento (inibição negativa) a baixas concentrações. Este fenómeno pode resultar tanto de hormese («estimulação por substâncias tóxicas») como da adição de fatores estimulantes do crescimento associados ao material em estudo adicionado ao meio de reserva. Cabe aqui notar que a adição de nutrientes inorgânicos não deverá, em princípio, ter qualquer efeito direto no ensaio, uma vez que o respetivo meio deve proporcionar um excedente de nutrientes ao longo de todo o ensaio. A estimulação a baixas concentrações pode geralmente ser ignorada para efeitos do cálculo de EC_{50}, exceto nos casos em que é extrema. Nesses casos de estimulação extrema, ou quando o valor de x em EC_x é muito baixo, pode ser necessário utilizar procedimentos especiais. A eliminação pura e simples das respostas de estimulação para efeitos da análise dos dados deve ser evitada sempre que possível e, nos casos em que os programas de ajustamento de curvas aos dados não consigam lidar com as consequências da estimulação a baixas concentrações, pode recorrer-se à interpolação linear com *bootstrapping*. Se a estimulação for extrema, pode considerar-se a possibilidade de utilizar um modelo de hormese (18).

Inibição não tóxica do crescimento

60. Os materiais em estudo que absorvam a luz podem ocasionar uma diminuição da taxa de crescimento por efeito da redução da quantidade de luz disponível. Esses efeitos de tipo físico devem ser ponderados de forma independente dos efeitos tóxicos, se necessário alterando as condições do ensaio, e apresentados separadamente. Para orientações sobre esta questão, ver as referências (2) (3).

RELATÓRIO DO ENSAIO

61. O relatório do ensaio deve incluir as seguintes informações:

▼**M6**

Produto químico em estudo:

— natureza física e propriedades físico-químicas relevantes, incluindo o limite de hidrossolubilidade;

— dados de identificação química (por exemplo: número CAS) e grau de pureza (eventual presença de impurezas).

Espécies sujeitas a ensaio:

— estirpe, fornecedor ou proveniência do organismo e condições de cultura utilizadas.

Condições de realização dos ensaios:

— data de início do ensaio e respetiva duração;

— descrição do planeamento do ensaio: recipientes de ensaio, volume das culturas, densidade da biomassa no início do ensaio;

— composição do meio;

— concentrações de ensaio e replicados (por exemplo: número de replicados, número de concentrações ensaiadas e progressão geométrica utilizada);

— descrição da preparação das soluções de ensaio, incluindo a eventual utilização de solventes, etc.

— equipamento de incubação;

— intensidade e qualidade da luz (fonte, homogeneidade);

— temperatura,

— concentrações ensaiadas: concentrações nominais de ensaio e resultados das análises para determinação da concentração do produto químico em estudo nos frascos de ensaio. Devem ser comunicados a eficácia de recuperação e o limite de quantificação do método na matriz de ensaio;

— todos os desvios em relação ao presente método de ensaio;

— método de determinação da biomassa e provas da correlação entre o parâmetro medido e o peso a seco.

Resultados:

— valores do pH no início e no final do ensaio, para todos os frascos expostos ao produto;

— biomassa em cada frasco e em cada ponto de medição, bem como o método utilizado para a sua medição;

— curvas de crescimento (gráficos da biomassa em função do tempo);

— variáveis de resposta calculadas para cada replicado exposto, com os respetivos valores médios, e coeficiente de variação dos replicados;

— representação gráfica da relação concentração/efeito;

▼M6

— estimativas da toxicidade para as variáveis de resposta, por exemplo: EC_{50}, EC_{10}, EC_{20}, e os intervalos de confiança associados. Quando forem calculados, valores da LOEC e da NOEC e métodos estatísticos utilizados para a respetiva determinação;

— caso tenha sido efetuada uma análise ANOVA, dimensão do efeito detetado (por exemplo, diferenças menos significativas);

— ocorrência de estimulação do crescimento que tenha sido verificada em qualquer dos grupos expostos;

— qualquer outro efeito observado, como, por exemplo, a alteração da morfologia das algas;

— discussão dos resultados, incluindo qualquer influência sobre os resultado do ensaio que decorra das alterações efetuadas ao presente método de ensaio.

REFERÊNCIAS

(1) Organização Internacional de Normalização (1993). ISO 8692 Water quality — Algal growth inhibition test.

(2) Organização Internacional de Normalização (1998). ISO/DIS 14442. Water quality — Guidelines for algal growth inhibition tests with poorly soluble materials, volatile compounds, metals and waster water.

(3) OCDE (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, no. 23. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

(4) Organização Internacional de Normalização (1998). ISO 5667-16 Water quality — Sampling — Part 16: Guidance on Biotesting of Samples.

(5) Mayer, P., Cuhel, R. & Nyholm, N. (1997). A simple in vitro fluorescence method for biomass measurements in algal growth inhibition tests. *Water Research* 31: 2525-2531.

(6) Slovacey, R.E. & Hanna, P.J. (1997). In vivo fluorescence determinations of phytoplancton chlorophyll, Limnology & Oceanography 22: 919-925

(7) Simpson, S.L., Roland, M.G.E., Stauber, J.L. & Batley, G.E. (2003). Effect of declining toxicant concentrations on algal bioassay endpoints. *Environ. Toxicol. Chem.* 22: 2073-2079.

(8) Christensen, E.R., Nyholm, N. (1984). Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. *Env. Sci. Technol*. 19: 713-718.

(9) Nyholm, N. Sørensen, P.S., Kusk, K.O. & Christensen, E.R. (1992). Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem*. 11: 157-167.

(10) Bruce, R.D.,and Versteeg, D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environ. Toxicol. Chem*. 11: 1485-1494.

(11) OCDE (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

▼**M6**

(12) Dunnett, C.W. (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statist. Assoc*. 50: 1096-1121

(13) Norberg-King T.J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. US EPA, Duluth, MN.

(14) Dunnett, C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20: 482-491.

(15) Williams, D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27: 103-117.

(16) Williams, D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28: 519-531.

(17) Draper, N.R. & Smith, H. (1981). Applied Regression Analysis, second edition. Wiley, New York.

(18) Brain, P. & Cousens, R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Research*, 29, 93-96.

▼M6

Apêndice 1

Definições

Para efeitos do presente método de ensaio, utilizam-se as seguintes definições e abreviaturas:

Biomassa: peso seco de matéria viva presente numa população, expresso por unidade de volume; por exemplo, mg de algas/litro de solução de ensaio. Normalmente, a biomassa é definida como uma massa, mas no presente ensaio o termo é utilizado na aceção de massa por unidade de volume. Ainda no presente ensaio, são normalmente medidos alguns valores alternativos de biomassa, como as contagens de células, a fluorescência, etc., sendo o termo «biomassa» utilizado também para essas medições alternativas.

Produto químico: uma substância ou mistura.

Coeficiente de variação: medida adimensional da variabilidade de um parâmetro, definida como a relação entre o desvio-padrão e a média. Esta medida pode igualmente ser expressa em termos de percentagem. No respeitante ao coeficiente de variação médio da taxa de crescimento específica média em culturas de controlo replicadas:

1. Calcular o CV, em percentagem, da taxa média de crescimento específico de cada replicado a partir das taxas de crescimento diárias/em cada secção do ensaio.

2. Calcular o valor médio de todos os valores calculados de acordo com o ponto 1, a fim de obter o coeficiente de variação médio das taxas de crescimento específico diárias/em cada secção do ensaio dos replicados das culturas de controlo.

EC_x: concentração do produto químico em estudo que, dissolvida no meio de ensaio, resulta numa redução de x % (por exemplo: 50 %) do crescimento do organismo de ensaio, após um determinado período de exposição (que deverá ser explicitamente mencionado nos casos em que se afaste da duração total ou normal do ensaio). A fim de indicar de forma inequívoca se o valor de EC se refere à taxa de crescimento ou ao rendimento, o símbolo «E_rC» é utilizado no primeiro caso e o símbolo «E_yC» no segundo.

Meio de cultura: meio de cultura sintético completo em que as algas de ensaio são cultivadas quando expostas ao produto químico em estudo. Em geral, o produto químico em estudo é dissolvido no meio de ensaio.

Taxa de crescimento (taxa média de crescimento específico): aumento logarítmico da biomassa durante o período de exposição.

Menor concentração com efeito observável (LOEC): concentração mais baixa à qual se observa que o produto químico em estudo tem um efeito estatisticamente significativo ($p < 0,05$) de redução do crescimento, quando comparada com o controlo, para um determinado período de exposição. No entanto, todas as concentrações de ensaio superiores à LOEC devem ter um efeito prejudicial igual ou superior ao verificado com a LOEC. Se estas duas condições não puderem ser satisfeitas, deve fornecer-se uma explicação circunstanciada sobre a forma como se determinou a LOEC (e, consequentemente, a NOEC).

Concentração sem efeitos observáveis (NOEC): concentração de ensaio imediatamente inferior à LOEC.

Variável de resposta: variável de estimação da toxicidade, derivada de qualquer dos parâmetros medidos que descrevem a biomassa por diferentes métodos de cálculo. No caso do presente método de ensaio, as taxas de crescimento e os rendimentos são variáveis de resposta derivadas da medição direta da biomassa ou de qualquer dos métodos alternativos mencionados.

▼**M6**

Taxa de crescimento específico: variável de resposta definida como o quociente da diferença entre os logaritmos naturais de um parâmetro de observação (no presente método, a biomassa) e o respetivo período.

Produto químico em estudo: qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado o presente método de ensaio.

Rendimento: valor de uma variável de medição no final do período de exposição menos o valor da variável de medição no início do período de exposição, que exprime o aumento da biomassa durante o ensaio.

▼M6

Apêndice 2

Estirpes que se revelaram adequadas para o ensaio

Algas verdes

Pseudokirchneriella subcapitata (anteriormente designada por *Selenastrum capricornutum*), ATCC 22662, CCAP 278/4, 61.81 SAG

Desmodesmus subspicatus (anteriormente designada por *Scenedesmus subspicatus*), 86.81 SAG

Diatomáceas

Navicula pelliculosa, UTEX 664

Cianobactérias

Anabaena flos-aquae, UTEX 1444, ATCC 29413, CCAP 1403/13A

Synechococcus leopoliensis, UTEX 625, CCAP 1405/1

Origem das estirpes

As estirpes recomendadas estão disponíveis sob a forma de culturas puras nas seguintes coleções (por ordem alfabética):

ATCC: American Type Culture Collection
10801 University Boulevard
Manassas, Virginia 20110-2209
EUA

CCAP, Culture Collection of Algae and Protozoa
Institute of Freshwater Ecology,
Windermere Laboratory
Far Sawrey, Amblerside
Cumbria LA22 0LP
REINO UNIDO

SAG: Collection of Algal Cultures
Inst. Plant Physiology
University of Göttingen
Nicholausberger Weg 18
37073 Göttingen
ALEMANHA

UTEX Culture Collection of Algae
Section of Molecular, Cellular and Developmental Biology
School of Biological Sciences
the University of Texas at Austin
Austin, Texas 78712
EUA

▼M6

Aspeto e características das espécies recomendadas

	P. subcapitata	*D. subspicatus*	*N. pelliculosa*	*A. flos-aquae*	*S. leopoliensis*
Aspeto	Células isoladas, curvadas e torcidas	Células ovais, na sua maioria isoladas	Barras ou varetas	Cadeias de células ovais	Barras ou varetas
Dimensões (C × L), em µm	8-14 × 2-3	7-15 × 3-12	7,1 × 3,7	4,5 × 3	6 × 1
Volume celular (μm^3/célula)	40-60 (1)	60-80 (1)	40-50 (1)	30-40 (1)	2,5 (2)
Peso seco das células (mg/célula)	$2 - 3 \times 10^{-8}$	$3 - 4 \times 10^{-8}$	$3 - 4 \times 10^{-8}$	$1 - 2 \times 10^{-8}$	$2 - 3 \times 10^{-9}$
Taxa de crescimento (3) (dia^{-1})	1,5-1,7	1,2-1,5	1,4	1,1-1,4	2,0-2,4

(1) Medido com contador eletrónico de partículas.
(2) Calculado a partir das dimensões.
(3) Taxa de crescimento mais frequentemente observada em meio OCDE com uma intensidade luminosa de aproximadamente 70 µE m^{-2} s^{-1}, a 21 °C.

Recomendações específicas quanto à cultura e ao manuseamento das espécies de ensaio recomendadas

Pseudokirchneriella subcapitata e Desmodesmus subspicatus

Estas algas verdes são geralmente fáceis de conservar em diferentes meios de cultura. Toda a informação sobre os meios mais adequados está disponível junto das coleções de culturas. As células apresentam-se normalmente isoladas e a sua densidade pode ser facilmente medida utilizando um contador eletrónico de partículas ou um microscópio.

Anabaena flos-aquae

Podem ser utilizados diferentes meios de cultura para manter uma cultura de arranque. É particularmente importante evitar que a cultura em meio líquido vá para além da fase de crescimento exponencial, já que a recuperação se torna difícil para lá desse ponto.

A *Anabaena flos-aquae* desenvolve agregados de cadeias de células. A dimensão desses agregados pode variar em função das condições de cultura. Para se poder proceder à contagem de células com um contador eletrónico de partículas ou com um microscópio, com vista à determinação da biomassa, poderá ser necessário quebrar os agregados.

As amostras podem ter de ser divididas em subamostras e ultrassonorizadas para quebrar as cadeias e reduzir a variabilidade das contagens. Se for demasiado prolongada, a ultrassonorização para quebrar as cadeias pode destruir as células. A intensidade e a duração da ultrassonorização devem ser idênticas para todas as amostras tratadas.

Contar as células num número suficiente de campos do hemocitómetro (pelo menos 400 células) para compensar a variabilidade. A fiabilidade das determinações através da densidade microscópica será assim maior.

O volume total de *Anabaena* pode ser determinado com um contador eletrónico de partículas, depois de quebrar as cadeias de células através de uma ultrassonorização cuidadosa. A energia dos ultrassons deve ser ajustada de forma a evitar provocar danos nas células.

Utilizar um agitador magnético de rotação ou outro método semelhante que permita garantir que a suspensão de algas utilizada para inocular os frascos de ensaio esteja bem misturada e seja homogénea.

▼M6

Os frascos de ensaio devem ser colocados num agitador orbital ou lateral, a cerca de 150 rotações por minuto. Em alternativa, pode utilizar-se uma agitação intermitente para reduzir a tendência para a criação de agregados de *Anabaena*. Se houver agregação, deve ter-se o cuidado de retirar amostras representativas para as medições de biomassa. Poderá ser necessário agitar vigorosamente os frascos imediatamente antes da mostra, de modo a desfazer os agregados de algas.

Synechococcus leopoliensis

Podem ser utilizados diferentes meios de cultura para manter uma cultura de arranque. As coleções de culturas disponibilizam informações sobre os meios mais adequados.

A *Synechococcus leopoliensis* apresenta células isoladas, em forma de bastonete. As células são muito pequenas, o que complica a utilização das contagens ao microscópio para a medição da biomassa. Pode utilizar-se um contador eletrónico de partículas equipado para a contagem de partículas com uma dimensão mínima aproximada de 1 μm. Outra possibilidade consiste na realização de medições fluorimétricas *in vitro*.

Navicula pelliculosa

Podem ser utilizados diferentes meios de cultura para manter uma cultura de arranque. As coleções de culturas disponibilizam informações sobre os meios mais adequados. De notar que o meio tem de conter silicatos.

Em certas condições de cultura, a *Navicula pelliculosa* pode formar agregados. Uma vez que produzem lípidos, as células têm por vezes tendência a acumular-se na película superficial. Nessas circunstâncias, têm de se adotar medidas especiais aquando da recolha das subamostras para determinação da biomassa, de modo a obter amostras representativas. Poderá ser necessária uma agitação vigorosa (por exemplo, com um agitador magnético de rotação).

▼M6

Apêndice 3

Meio de cultura

Pode utilizar-se um dos dois meios de cultura seguintes:

— Meio OCDE: meio original do método OECD TG 201, norma ISO 8692;

— Meio US EPA AAP, norma ASTM.

Para a preparação destes meios, devem utilizar-se reagentes e produtos químicos de qualidade analítica e água desionizada.

Composição do meio AAP (US EPA) e do meio OECD TG 201

Componente	AAP		OCDE	
	mg/l	mM	mg/l	mM
$NaHCO_3$	15,0	0,179	50,0	0,595
$NaNO_3$	25,5	0,300		
NH_4Cl			15,0	0,280
$MgCl_2 \cdot 6(H_2O)$	12,16	0,0598	12,0	0,0590
$CaCl_2 \cdot 2(H_2O)$	4,41	0,0300	18,0	0,122
$MgSO_4 \cdot 7(H_2O)$	14,6	0,0592	15,0	0,0609
K_2HPO_4	1,044	0,00599		
KH_2PO_4			1,60	0,00919
$FeCl_3 \cdot 6(H_2O)$	0,160	0,000591	0,0640	0,000237
$Na_2EDTA \cdot 2(H_2O)$	0,300	0,000806	0,100	0,000269*
H_3BO_3	0,186	0,00300	0,185	0,00299
$MnCl_2 \cdot 4(H_2O)$	0,415	0,00201	0,415	0,00210
$ZnCl_2$	0,00327	0,000024	0,00300	0,0000220
$CoCl_2 \cdot 6(H_2O)$	0,00143	0,000006	0,00150	0,00000630
$Na_2MoO_4 \cdot 2(H_2O)$	0,00726	0,000030	0,00700	0,0000289
$CuCl_2 \cdot 2(H_2O)$	0,000012	0,00000007	0,00001	0,00000006
pH	7,5		8,1	

A razão molar EDTA/ferro é ligeiramente superior a uma unidade, o que permite evitar a precipitação do ferro e, em simultâneo, minimizar a quelação dos iões de metais pesados.

Nos ensaios com a diatomácea *Navicula pelliculosa*, ambos os meios devem ser complementados com $Na_2SiO_3 \cdot 9H_20$, na quantidade necessária para obter uma concentração final de 1,4 mg Si/l.

▼**M6**

O pH do meio é função do equilíbrio entre o sistema carbonato do meio e a pressão parcial de CO_2 no ar atmosférico. A relação aproximada entre o pH a 25 °C e a concentração molar de bicarbonato é dada por:

$pH_{eq} = 11{,}30 + \log[HCO_3]$

Com 15 mg $NaHCO_3$/l, pH_{eq} = 7,5 (meio US EPA) e com 50 mg $NaHCO_3$/l, pH_{eq} = 8,1 (meio OCDE).

Composição elementar dos meios de ensaio

Elemento	AAP	OCDE
	mg/l	mg/l
C	2,144	7,148
N	4,202	3,927
P	0,186	0,285
K	0,469	0,459
Na	11,044	13,704
Ca	1,202	4,905
Mg	2,909	2,913
Fe	0,033	0,017
Mn	0,115	0,115

Preparação do meio OCDE

Nutrientes	Concentração na solução de reserva
Solução de reserva 1: macronutrientes	
NH_4Cl	1,5 g/l
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	1,2 g/l
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1,8 g/l
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,5 g/l
KH_2PO_4	0,16 g/l
Solução de reserva 2: ferro:	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	64 mg/l
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	100 mg/l
Solução de reserva 3: oligoelementos	
H_3BO_3	185 mg/l
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	415 mg/l
$ZnCl_2$	3 mg/l

▼**M6**

Nutrientes	Concentração na solução de reserva
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,5 mg/l
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,01 mg/l
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	7 mg/l
Solução de reserva 4: bicarbonato	
$NaHCO_3$	50 g/l
$Na_2SiO_3 \cdot 9H_20$	

Esterilizar as soluções de reserva por filtração através de membrana (diâmetro dos poros 0,2 μm) ou em autoclave (120 °C, 15 min). Armazenar as soluções ao abrigo da luz, a 4 °C.

Não esterilizar as soluções 2 e 4 em autoclave, mas sim por filtração através de membrana.

Preparar o meio de cultura adicionando à água um volume apropriado das soluções de reserva 1-4.

Adicionar a 500 ml de água esterilizada:

10 ml da solução de reserva 1

1 ml da solução de reserva 2

1 ml da solução de reserva 3

1 ml da solução de reserva 4

Completar o volume até 1 000 ml, com água esterilizada.

Permitir que decorra um tempo suficiente para que o meio atinja o equilíbrio com o CO_2 atmosférico, se necessário borbulhando com ar estéril filtrado durante algumas horas.

Preparação do meio US EPA

1. Adicionar 1 ml de cada uma das soluções de reserva descritas em *2.1–2.7* a cerca de 900 ml de água desionizada ou destilada, completando depois o volume até 1 litro.

2. As soluções de reserva de macronutrientes são preparadas dissolvendo os seguintes elementos em 500 ml de água desionizada ou destilada. Os reagentes *2.1, 2.2, 2.3* e *2.4* podem ser combinados numa única solução de reserva.

2,1	$NaNO_3$	12,750 g
2,2	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	6,082 g
2,3	$CaCl_2 2H_2O$	2,205 g
2,4	Solução de reserva de micronutrientes (ver 3)	
2,5	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	7,350 g
2,6	K_2HPO_4	0,522 g.
2,7	$NaHCO_3$	7,500 g
2,8	$Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$	ver nota 1.

▼**M6**

Nota 1: Utilizar exclusivamente se a espécie de ensaio for uma diatomácea. O composto pode ser acrescentado diretamente (202,4 mg) ou utilizando uma solução de reserva que permita obter uma concentração final de Si de 20 mg/l no meio.

3. As soluções de reserva de micronutrientes são preparadas dissolvendo os seguintes elementos em 500 ml de água desionizada ou destilada:

3,1	H_3BO_3	92,760	mg
3,2	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	207,690	mg
3,3	$ZnCl_2$	1,635	mg
3,4	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	79,880	mg
3,5	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,714	mg
3,6	$Na2MoO_4 \cdot 2H_2O$	3,630	mg
3,7	$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,006	mg
3,8	$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	150,000	mg [(etilenodinitrilo) tetracetato dissódico]
3,9	$Na_2SeO_4 \cdot 5H_2O$	0,005	mg; ver nota 2.

Nota 2: Utilizar exclusivamente no meio para as culturas de arranque de espécies de diatomáceas.

4. Ajustar o pH a 7,5 ± 0,1 com solução 0,1 *N* ou 1,0 *N* de NaOH ou de HCl.

5. Filtrar os meios para um recipiente esterilizado através de um filtro de membrana com um diâmetro de poro de 0,22 μm, se se pretender utilizar um contador eletrónico de partículas, ou de 0,45 μm, se não for esse o caso.

6. Armazenar o meio ao abrigo da luz, a 4 °C, até ao momento da utilização.

▼M6

Apêndice 4

Exemplo de um procedimento para a cultura de algas

Observações gerais

O objetivo de proceder a uma cultura com base no procedimento a seguir descrito consiste em proporcionar culturas de algas para ensaios de toxicidade.

Devem utilizar-se métodos que permitam garantir que as culturas de algas não são infetadas por bactérias. Mesmo que se pretendam utilizar culturas puras, devem preparar-se e conservar-se culturas de cada uma das diferentes espécies de algas.

Todas as operações devem ser realizadas em condições de esterilidade, de modo a evitar a contaminação por bactérias ou por outras algas.

Equipamento e material

No ponto «Método de Ensaio», ver: «Equipamento».

Procedimentos para a obtenção de culturas de algas

Preparação das soluções de nutrientes (meios de cultura):

Todos os sais nutrientes do meio são preparados como soluções de reserva concentradas e armazenados ao abrigo da luz e ao frio. As soluções são esterilizadas por filtração ou em autoclave.

O meio é preparado misturando a quantidade correta de solução de reserva com água destilada esterilizada, tomando o cuidado de evitar infeções. No caso dos meios sólidos, é acrescentado ágar-ágar à concentração de 0,8 %.

Cultura de reserva:

As culturas de reserva são culturas de algas com pequeno volume que são regularmente transferidas para meio fresco, de modo a que possam ser utilizadas como inóculo para os ensaios. Se as culturas não forem regularmente utilizadas, são conservadas em tubos de ágar-ágar inclinados. São transferidas para um meio fresco pelo menos de dois em dois meses.

As culturas de reserva são feitas em frascos cónicos (com um volume de cerca de 100 ml), com o meio apropriado. Quando as algas são incubadas à temperatura de 20 °C com iluminação contínua, é necessário fazer uma transferência semanal.

Durante a transferência, uma determinada quantidade da cultura «antiga» é transferida com uma pipeta esterilizada para um frasco com meio fresco, de modo a obter, para as espécies de crescimento rápido, uma concentração inicial cerca de 100 vezes inferior à que existia na cultura original.

A taxa de crescimento de uma espécie pode ser determinada a partir da sua curva de crescimento. A partir do momento em que esta seja conhecida, é possível estimar a densidade a que a cultura deve ser transferida para o meio fresco. A transferência deve ser feita antes de a cultura atingir a fase de morte celular.

Pré-cultura:

O objetivo da pré-cultura é obter uma quantidade de algas adequada para a inoculação das culturas de ensaio. A pré-cultura é incubada em condições de ensaio e utilizada enquanto se encontra na fase exponencial, normalmente após um período de incubação de 2 a 4 dias. Quando as culturas de algas apresentam células deformadas ou anormais, devem ser descartadas.

▼M6

Apêndice 5

Análise dos dados por regressão não linear

Considerações gerais

A resposta dos ensaios com algas e de outros ensaios de crescimento microbiano — o aumento da biomassa é, por natureza, uma variável contínua ou métrica — terá a forma de uma taxa quando se utilizar a taxa de crescimento ou de um integral em função do tempo se se escolher utilizar a quantidade de biomassa. Ambas as variáveis são referenciadas em função da resposta média dos replicados de controlo, não expostos, que apresentem uma resposta mais elevada às condições vigentes — sendo que a temperatura e a luz são os principais fatores determinantes nos ensaios com algas. O sistema é distribuído ou homogéneo, e a biomassa pode ser vista como um valor contínuo, sem tomar em consideração as células individuais. A distribuição das variâncias do tipo de resposta está, nesses sistemas, exclusivamente relacionada com os fatores experimentais (tipicamente descritos pela curva log normal ou pela distribuição normal dos erros). Esta situação contrasta com as respostas típicas dos bioensaios com dados quantais, nos quais a tolerância (tipicamente distribuída de forma binomial) de cada organismo é frequentemente assumida como a componente dominante da variância. As respostas dos controlos são, nesse caso, nulas ou correspondentes à linha de base.

Numa situação sem complicações, a resposta normalizada ou relativa, *r*, diminui de forma monotónica entre 1 (inibição nula) e 0 (inibição a 100 %). De notar que todas as respostas têm um erro associado, pelo que se podem constatar inibições negativas apenas por efeito dos erros aleatórios.

Análise de regressão

Modelos

O objetivo da análise de regressão é a descrição quantitativa da curva de concentração-resposta, sob a forma de uma função matemática de regressão Y = f (C) ou, mais frequentemente, F(Z), onde Z = log C. A utilização da função inversa C = f^{-1} (Y) permite o cálculo dos valores de EC_x, incluindo a EC_{50}, EC_{10} e EC_{20}, bem como dos respetivos limites de confiança a 95 %. Podem utilizar-se diversas funções matemáticas simples para uma boa descrição da relação concentração-resposta obtida em ensaios de inibição de crescimento com algas. Essas funções incluem, por exemplo, a equação logística, a equação assimétrica de Weibull e a função de distribuição log normal, todas curvas sigmoides que se aproximam da assíntota 0 quando C → 0 e da assíntota 1 quando C → infinito.

Foi recentemente proposta como alternativa aos modelos assintóticos a utilização de modelos com uma função de limite contínuo, como, por exemplo, o modelo de Kooijman para a inibição do crescimento populacional — Kooijman *et al*., 1996. Esse modelo assume que não há qualquer efeito às concentrações que se encontram abaixo de um determinado limite, EC_0+, estimado por extrapolação, a partir da relação concentração-resposta, do ponto de interceção do eixo das concentrações, aplicando uma função contínua simples não diferenciada no ponto inicial.

De notar que a análise em causa pode ser uma simples minimização da soma dos mínimos quadrados (assumindo uma variância constante) ou dos quadrados ponderados, quando for necessário compensar para uma variância heterogénea.

Procedimento de ensaio

O procedimento pode ser esquematizado do seguinte modo: selecionar uma equação Y = f(C) apropriada e ajustá-la aos dados por regressão não linear. Usar, de preferência, as medições de cada frasco, em vez do valor médio dos replicados, de modo a extrair tanta informação quanto possível dos dados disponíveis. Por outro lado, se a variância for elevada, a experiência sugere que os

▼M6

valores médios dos replicados podem resultar numa estimativa matematicamente mais robusta e menos influenciada por erros sistemáticos que possam afetar dados do que quando se utilizam os valores medidos em cada frasco.

Desenhar a curva ajustada e marcar os pontos medidos, verificando se há um bom ajustamento. A análise dos mínimos quadrados pode ser um instrumento particularmente útil para este fim. Se a função escolhida para o ajustamento da curva de concentração-resposta não descrever a totalidade da curva ou de alguma das suas partes essenciais, como, por exemplo, a resposta a baixas concentrações, selecionar outra opção de ajustamento da curva — por exemplo: uma curva assimétrica, como a equação de Weibull, em vez de uma curva simétrica. A inibição negativa pode (por exemplo, no caso da função de distribuição log-normal) constituir um problema que também poderá tornar necessária a utilização de uma função de regressão alternativa. Não se recomenda a atribuição de um valor zero ou de um valor positivo baixo a esses valores negativos, já que tal procedimento distorceria a distribuição dos erros. Pode ser adequado proceder a diferentes ajustamentos para cada parte da curva (por exemplo, na parte da baixa inibição), para estimar os valores de $EC_{x\ baixo}$. Calcular, a partir da equação ajustada [por «estimativa inversa», $C = f^{-1}(Y)$], as estimativas de alguns pontos EC_x característicos, comunicando, no mínimo, o valor de EC_{50} e o valor estimado de um ou de dois $EC_{x\ baixo}$. A experiência com ensaios práticos demonstra que a precisão dos ensaios com algas permite em geral uma estimativa razoavelmente correta do nível de 10 % de inibição, se se dispuser de um número suficiente de pontos medidos — exceto nos casos em que haja estimulação a baixas concentrações, o que poderá ser fator de confusão. A precisão das estimativas de EC_{20} é muitas vezes consideravelmente maior do que para a EC_{10}, porque o ponto EC_{20} se encontra normalmente na parte central, quase linear, da curva de concentração-resposta. Por vezes, o valor da EC_{10} pode ser difícil de estimar, devido à promoção do crescimento a baixas concentrações. Assim, embora a EC_{10} possa normalmente ser obtida com uma precisão suficiente, recomenda-se que seja sempre comunicado também a EC_{20}.

Fatores de ponderação

Normalmente, a variância experimental não é constante e, na maior parte dos casos, inclui uma componente proporcional, pelo que há vantagem em realizar, por rotina, uma regressão ponderada. Geralmente, assume-se que os fatores de ponderação utilizados nesse tipo de análise são inversamente proporcionais à variância:

$$W_i = 1/Var(r_i)$$

Diversos programas de regressão permitem, como opção, uma análise de regressão ponderada com fatores de conversão apresentados sob a forma de listas. O mais conveniente é normalizar os fatores de ponderação, isto é, multiplicá-los por $n/\Sigma\ w_i$ (em que *n* é o número de pontos experimentais) de modo a que a respetiva soma seja igual a 1.

Respostas de normalização

A normalização em função da resposta média dos controlos suscita problemas de princípio e tem como resultado uma estrutura de variâncias bastante complexa. Ao dividir as respostas pelo valor médio da resposta dos controlos, para obter a inibição percentual, introduz-se um erro adicional decorrente do erro na média dos controlos. Exceto nos casos em que esse erro é negligenciável, os fatores de ponderação da regressão e dos limites de confiança têm de ser corrigidos em relação à covariância com o controlo (Draper e Smith, 1981). Cabe aqui notar que é importante obter estimativas de alta precisão do valor médio da resposta dos controlos, de modo a minimizar a variância global para a resposta relativa. Essa variância pode ser descrita do seguinte modo:

(o *i* em índice faz referência ao nível de concentração *i*, enquanto que o 0 em índice se refere aos controlos)

$$Yi = \text{Resposta relativa} = r_i/r_0 = 1 - I = f(C_i)$$

▼**M6**

sendo a variância $Var(Y_i) = Var\ (r_i/r_0) \cong (\partial Yi\ /\ \partial\ r_i)^2 \cdot Var(r_i) + ((\partial\ Y_i/\ \partial\ r_0)^2 \cdot Var(r_0)$

e, tendo em conta que: $(\partial\ Y_i/\ \partial\ r_i) = 1/r_0$ e $(\partial\ Y_i/\ \partial\ r_0) = r_i/r_0^2$

com uma distribuição normal e replicados m_i e m_0: $Var(r_i) = \sigma^2/m_i$

a variância total da resposta relativa, Y_i, passa portanto a ser:

$$Var(Y_i) = \sigma^2/(r_0^2 \cdot m_i) + r_i^2 \cdot \sigma^2/r_0^4 \cdot m_0$$

O erro da média dos controlos é inversamente proporcional à raiz quadrada do número de replicados do controlo utilizados para o cálculo dessa média, podendo por vezes justificar-se a inclusão de dados históricos para reduzir fortemente o erro. Há um procedimento alternativo que consiste em não normalizar os dados e fazer o ajustamento das respostas absolutas, incluindo os dados de resposta dos controlos, mas introduzindo como parâmetro adicional a ajustar por regressão não linear o valor de resposta dos controlos. No caso das equações de regressão habitualmente utilizadas, com 2 parâmetros, este método exige o ajustamento de 3 parâmetros, pelo que necessita de mais pontos do que a regressão não linear de dados que tenham sido normalizados utilizando uma resposta do controlo pré-definida.

Intervalos de confiança inversos

O cálculo de intervalos de confiança da regressão não linear por estimativa inversa é bastante complexo e não constitui normalmente uma opção disponível nos pacotes estatísticos informáticos mais comuns. É possível obter uma aproximação dos limites de confiança utilizando programas normais de regressão não linear com reparametrização (Bruce e Versteeg, 1992), o que implica voltar a escrever a equação matemática com os pontos que se pretende estimar: por exemplo, EC_{10} e EC_{50}, como os parâmetros a determinar. (Partindo da função I = f (α, β, concentração), utilizar as relações de definição f (α, β, EC_{10}) = 0,1 e f (α, β, EC_{50}) = 0,5 para substituir f (α, β, concentração) por uma função equivalente g (EC_{10}, EC_{50}, concentração).

Pode efetuar-se um cálculo mais direto (Andersen *et al*, 1998) mantendo a equação original e utilizando uma expansão de Taylor em redor dos valores médios de r_i e de $r_{0.}$.

Recentemente, têm vindo a ganhar popularidade os métodos de «*boot strapping*», que utilizam os dados medidos e uma reamostragem frequente, determinada por um gerador de números aleatórios, para estimar uma distribuição empírica da variância.

REFERÊNCIAS

Kooijman, S.A.L.M.; Hanstveit, A. O.; Nyholm, N. (1996): No-effect concentrations in algal growth inhibition tests. *Water Research*, 30, 1625-1632.

Draper, N. R. & Smith, H. (1981). Applied Regression Analysis, second edition. Wiley, New York.

Bruce, R. D. & Versteeg, D. J. (1992). A Statistical Procedure for Modelling Continuous Ecotoxicity Data. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 1485-1494.

Andersen, J. S., Holst, H., Spliid, H., Andersen, H., Baun, A. & Nyholm, N. (1998). Continuous ecotoxicological data evaluated relative to a control response. *Journal of Agricultural, Biological and Environmental Statistics*, 3, 405-420.

▼B

C.4. DETERMINAÇÃO DA BIODEGRADABIL1DADE «FÁCIL»

PARTE I. CONSIDERAÇÕES GERAIS

I.1. INTRODUÇÃO

Descrevem-se seis métodos de ensaio que permitem fazer o despiste da biodegradabilidade fácil de substâncias químicas, num meio aquoso aeróbio:

a) Redução gradual do Carbono Orgânico Dissolvido (COD) (método C.4-A);

b) Método de despiste da OCDE modificado — redução gradual do COD (método C.4-B);

c) Libertação de dióxido de carbono (CO_2) (teste de Sturm modificado) (método C.4-C);

d) Respirometria manométrica (método C.4-D);

e) Frasco fechado (método C.4-E);

f) MITI (Ministério do Comércio Internacional e da Indústria — Japão) (método C.4-F).

As considerações gerais e também as considerações comuns aos seis testes figuram na parte I do método. Os aspectos específicos de cada método são descritos nas partes II a VII. Os apêndices contêm definições, fórmulas e anotações informativas.

Um exercício comparativo interlaboratorial organizado pela OCDE, efectuado em 1988, demonstrou que os métodos permitem obter resultados consistentes. Todavia, consoante as características físicas da substância que se pretende testar, assim se dará preferência a um ou outro método.

I.2. SELECÇÃO DO MÉTODO APROPRIADO

No sentido de se seleccionar o método mais adequado, é essencial dispor de informações sobre a solubilidade, a pressão de vapor e as características de adsorção das substâncias químicas. A estrutura química ou a fórmula química devem ser conhecidas para o cálculo dos valores teóricos e/ou confirmação dos valores medidos dos parâmetros característicos, por exemplo, CTeO, CO_2Te, COD, COT, CQO (ver apêndices 1 e 2).

As substâncias químicas de ensaio que forem solúveis em água na proporção de pelo menos 100 mg/l podem ser avaliadas por todos os métodos, desde que não sejam voláteis e não sejam adsorventes. Para as substâncias químicas que forem pouco solúveis em água, voláteis ou adsorventes, os métodos adequados são indicados no quadro 1. No apêndice 3 é descrito o modo de proceder com as substâncias químicas pouco solúveis em água e com as substâncias químicas voláteis. As substâncias químicas moderadamente voláteis podem ser testadas pelo método de redução gradual do COD, se existir espaço livre suficiente para o gás nos recipientes de ensaio (os quais devem estar adequadamente tapados). Neste caso deve ser efectuado um controlo abiótico que permita detectar eventuais perdas físicas.

▼B

Quadro 1

aplicabilidade dos métodos de ensaio

Teste	Método analítico	Adequado para substâncias que são:		
		pouco solúveis	voláteis	adsorvíveis
Redução gradual do COD	Carbono orgânico dissolvido	—	—	+/-
Redução gradual do COD/ /método OCDE	Carbono orgânico dissolvido	—	—	+/-
Libertação de CO_2	Respirometria: libertação de CO_2	+	—	+
Respirometria manométrica	Respirometria manométrica: consumo de oxigénio	+	+/-	+
Frasco fechado	Respirometria: oxigénio dissolvido	+/-	+	+
MITI	Respirometria: consumo de oxigénio	+	+/-	+

É necessário dispor de informações sobre a pureza ou sobre as proporções relativas dos componentes principais do material de ensaio para interpretar os resultados obtidos, especialmente quando os resultados são baixos ou marginais.

O facto de se dispor de informações sobre a toxicidade da substância química de teste em relação às bactérias (apêndice 4) pode ser muito útil para seleccionar concentrações de ensaio adequadas e pode ser essencial para a interpretação correcta de valores baixos de biodegradação.

I.3. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

Para se controlar o processo testam-se substâncias químicas de referência que satisfaçam os critérios de biodegradabilidade fácil, realizando uma experiência num frasco adequado, em paralelo com os procedimentos normais.

As substâncias químicas adequadas são a anilina (recentemente destilada), o acetato de sódio e o benzoato de sódio. Todas estas substâncias químicas de referência degradam-se ao serem submetidas a estes métodos, mesmo quando nenhum inóculo é deliberadamente adicionado.

Foi sugerida a utilização de uma substância química de referência que fosse facilmente biodegradável, mas que necessitasse da adição de um inóculo. Foi sugerida a utilização de hidrogenoftalato de potássio mas é necessário obter mais provas de eficácia com esta substância, antes que possa ser aceite como substância de referência.

Nos ensaios respirométricos, os compostos que contêm azoto podem afectar o consumo de oxigénio devido à nitrificação (ver apêndices 2 e 5).

I.4. PRINCÍPIO DOS MÉTODOS DE ENSAIO

Faz-se a inoculação de uma solução ou suspensão da substância de ensaio num meio mineral e, depois, procede-se à incubação sob condições aeróbias, ao abrigo da luz ou sob luz difusa. A quantidade de COD na solução de ensaio originada pelo inóculo deverá ser mantida o mais baixo possível relativamente à quantidade de COD originada pela substância de ensaio. Tem-se em conta a actividade endógena do inóculo efectuando ensaios paralelos em branco, com inóculo, mas sem a substância de ensaio, embora a actividade endógena das células na presença da substância não seja exactamente a mesma que no controlo endógeno. Efectua-se um ensaio em paralelo com a substância de referência, para verificação do processo.

▼B

Em geral, acompanha-se a degradação determinando parâmetros característicos, tais como o COD, a produção de CO_2 e o consumo de oxigénio, efectuando-se medições com suficiente frequência, de modo a identificar o início e o fim da biodegradação. Com os respirómetros automáticos as medições são contínuas. O COD é por vezes medido em conjunto com outro parâmetro mas normalmente isso só sucede no início e no fim do ensaio. Também se pode recorrer a análises químicas específicas para avaliar a degradação primária da substância de ensaio e para se determinar a concentração de quaisquer substâncias intermédias formadas (obrigatório no teste de MITI).

Normalmente, o ensaio prolonga-se por 28 dias. Todavia, os ensaios podem ser terminados antes de decorridos 28 dias, isto é, logo que a curva de biodegradação tenha atingido um patamar que envolva pelo menos 3 determinações. Os ensaios também podem ser prolongados para além do período de 28 dias, no caso de a curva mostrar que se iniciou a biodegradação mas que o patamar não foi atingido até ao 28.º dia.

I.5. CRITÉRIOS DE QUALIDADE

I.5.1. **Reprodutibilidade**

Devido à natureza da biodegradação e das populações bacterianas mistas utilizadas como inóculos, as determinações devem ser efectuadas pelo menos em duplicado.

Sabe-se pela experiência que, quanto maior for a concentração de microorganismos adicionados inicialmente ao meio de ensaio, menores serão as diferenças entre repetições. Ensaios interlaboratoriais demonstram também que pode haver grandes diferenças entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes, embora se obtenha, normalmente, uma boa concordância quando se utilizam compostos facilmente biodegradáveis.

I.5.2. **Validade do ensaio**

Considera-se que um ensaio é válido se a diferença entre valores extremos de repetições de desaparecimento da substância química de ensaio, no patamar, no fim do teste ou no final dos 10 dias, for inferior a 20 % e se a percentagem de degradação da substância de referência atingir o nível de biodegradabilidade fácil ao fim de 14 dias. Se qualquer uma destas condições não for satisfeita, o ensaio deve ser repetido. Devido à especificidade dos métodos, os valores baixos não significam necessariamente que a substância de ensaio não seja biodegradável nas condições ambientais, mas significa que serão necessários novos estudos para se provar a biodegradabilidade.

Se num ensaio de toxicidade, contendo tanto a substância de ensaio como a substância química de referência, ocorrer uma degradação inferior a 35 % (tomando como base o COD) ou inferior a 25 % (tomando como base CTeO ou CO_2Te) decorridos 14 dias, pode admitir-se que as substâncias químicas de ensaio são inibidoras (ver também o apêndice 4). As sequências de ensaio deverão ser repetidas, utilizando, se possível, uma concentração inferior da substância química de ensaio e/ou uma concentração superior de inóculo, mas não superior a 30 mg de sólidos/litro.

I.6. PREPARAÇÕES E PROCEDIMENTOS GERAIS

As condições gerais aplicáveis aos ensaios são resumidas no quadro 2. O equipamento e outras condições experimentais correspondentes especificamente a um determinado ensaio são descritas depois, sob o título desse ensaio.

▼B

Quadro 2

condições de ensaio

Ensaio	Redução gradual de COD	Libertação de CO_2	Respirometria manométrica	Despiste da OCDE modificado	Frasco fechado	M1T1 (I)
Concentração da substância de ensaio						
mg/l			100		2–10	100
mg COD/l	10–40	10–20		10–40		
mg CTeO/l			50–100		5–10	
Concentração do inóculo (em células/l, aproximadamente)	≤ 30 mg/l SS ou ≤100 ml de efluente/l (10^7- 10^8)			0,5 ml de efluente secundário/l (10^5)	< 5 ml de efluente/l (10^4- 10^6)	30 mg/l SS (10^7- 10^8)
Concentração de elementos no meio mineral (em mg/l):						
P	116				11,6	29
N	1,3				0,13	1,3
Na	86				8,6	17,2
K	122				12,2	36,5
Mg	2,2				2,2	6,6
Ca	9,9				9,9	29,7
Fe	0,05-0,1				0,05-0,1	0,15
pH	7,4 ± 0,2					preferencialmente 7,0
Temperatura	22 ± 2°C					25 ± 1°C

COD = Carbono Orgânico Dissolvido CTeO = Carência Teórica de Oxigénio SS =

I.6.1. **Água de diluição**

É usada água desionizada ou destilada, livre de substâncias tóxicas (por exemplo iões Cu^{++}) em concentrações inibidoras. Não deve conter mais do que 10 % do teor de carbono orgânico introduzido pela substância de ensaio. É necessária uma elevada pureza para a água de ensaio para evitar um elevado número de valores em branco. A contaminação pode resultar de impurezas inerentes e também de resinas de permuta iónica e do material lisado de bactérias e algas. Para cada série de ensaios utiliza-se apenas um lote de água, controlada previamente por análise do COD. Tal controlo não é necessário no teste do frasco fechado, mas o consumo de oxigénio da água deve ser baixo.

▼B

I.6.2. **Soluções de reserva de componentes minerais**

Para se preparar as soluções de ensaio recorre-se a utilização de soluções de reserva com concentrações apropriadas de componentes minerais. É possível utilizar as seguintes soluções de reserva (com diversos factores de diluição) para os métodos de redução gradual do COD, despiste da OCDE modificado, libertação de CO_2, respirometria manométrica, ensaio em frasco fechado.

Os factores de diluição e, no caso do ensaio de MITI, a preparação específica do meio mineral, são indicados sob os títulos dos ensaios específicos.

Soluções de reserva:

Preparam-se as seguintes soluções de reserva utilizando reagentes da qualidade analítica.

a) Dihidrogeno-ortofosfato monopotássico, KH_2PO_4 8,50 g

Monohidrogeno-ortofosfato dipotássico, K_2HPO_4 21,75 g

Monohidrogeno-ortofosfato dissódico dihidratado, $Na_2HP0_4 . 2H_2O$ 33,40 g

Cloreto de amónio, NH_4Cl

Dissolver em água e ajustar até ao volume de 1 litro. O pH da solução deverá ser 7,4;

b) Cloreto de cálcio anidro, $CaCl_2$ 27,50 g

ou cloreto de cálcio dihidratado, $CaCl_2 . 2H_2O$ 36,40 g

Dissolver em água e ajustar o volume até 1 litro;

c) Sulfato de magnésio heptahidratado, $MgSO_4 . 7H_2O$ 22,50 g

Dissolver em água e ajustar o volume até 1 litro;

d) Cloreto de ferro (III) hexahidratado, $FeCl_3 . 6H_2O$ 0,25 g

Dissolver em água e ajustar o volume até 1 litro.

Nota: Para não se ter de preparar esta solução imediatamente antes da sua utilização adiciona-se-lhe uma gota de HC1 concentrado ou 0,4 g do sal dissódico do ácido etilenodiarninatetracético (EDTA) por litro.

I.6.3. **Soluções de reserva das substâncias químicas**

Quando a solubilidade for superior a 1 g/l, dissolver 1-10 g, por exemplo, conforme for apropriado, da substância química de ensaio ou de referência em água desionizada e ajustar o volume a 1 litro. Caso contrário, preparar soluções de reserva em meio mineral e adicionar a substância química directamente ao meio mineral. Para o caso de substâncias químicas de menor solubilidade veja-se o apêndice 3; no teste do MITI (método C.4-F) não serão utilizados nem solventes nem agentes emulsionantes.

▼B

I.6.4. **Inóculos**

O inóculo pode ser obtido a partir de uma diversidade de origens: lamas activadas, efluentes de esgotos (não clorados), solos e águas superficiais ou a partir de uma mistura dessas origens. Para os ensaios de redução gradual do COD, de libertação de CO_2 e de respirometria manométrica, no caso de se utilizarem lamas activadas estas devem ser obtidas a partir de uma estação de tratamento ou de uma unidade laboratorial que receba essencialmente águas residuais domésticas. Verificou-se que os inóculos provenientes de outras origens provocam uma maior dispersão de resultados. Nos ensaios de despiste da OCDE modificado e de frasco fechado é necessário um inóculo mais diluído, sem partículas de lama, sendo a fonte preferencial um efluente secundário proveniente de uma estação de tratamento de resíduos domésticos ou de uma unidade laboratorial. No caso do ensaio de MITI, o inóculo provém de uma mistura de origens, sendo descrito sob o título do ensaio específico.

I.6.4.1. *Inóculo de lamas activadas*

Recolher uma amostra de lamas activadas recentes, provenientes de um tanque de arejamento de uma estação de tratamento de esgotos ou de uma unidade laboratorial que trate essencialmente esgotos domésticos. Remover as partículas grosseiras, se necessário por filtração através de um crivo fino, e manter posteriormente as lamas em estado aeróbio.

Em alternativa, deixar sedimentar ou centrifugar (por exemplo, a 1 100 g durante 10 minutos) depois da remoção de todas as partículas grosseiras. Rejeitar o sobrenadante. As lamas podem ser lavadas em meio mineral. Preparar uma suspensão das lamas concentradas em meio mineral, para se obter uma concentração de 3-5 g de sólidos em suspensão/l e efectuar o arejamento enquanto for necessário.

As lamas devem ser obtidas a partir de uma adequada estação de tratamento. Se as lamas forem obtidas de uma estação de tratamento de grandes caudais ou nas quais se admite a presença de inibidores, devem ser lavadas. Deixar sedimentar ou centrifugar as lamas da nova suspensão após mistura profunda, rejeitar o sobrenadante e preparar outra suspensão das lamas lavadas num novo volume de meio mineral. Repetir este procedimento até se concluir que as lamas não possuem inibidor ou substrato em excesso.

Depois de se ter obtido uma nova suspensão, ou quando se utilizam lamas não tratadas, retirar uma amostra imediatamente antes da sua utilização para determinação do resíduo seco correspondente às substâncias sólidas em suspensão.

Outra alternativa consiste em homogeneizar as lamas activadas (3--5 g de sólidos em suspensão/l). Tratar as lamas num misturador mecânico durante 2 minutos, a uma velocidade média. Deixar sedimentar a mistura de lamas durante 30 minutos ou durante um período mais longo, se necessário, e decantar o líquido para utilização como inóculo na proporção de 10 ml/l de meio mineral.

I.6.4.2. *Outras fontes de inóculo*

Este pode ser obtido a partir de um efluente secundário de uma estação de tratamento ou de uma unidade laboratorial que receba essencialmente resíduos domésticos. Recolher uma amostra fresca e conservá-la aerobicamente durante o transporte. Deixar sedimentar durante uma hora ou filtrar através de papel de filtro para partículas grosseiras e conservar aerobicamente o efluente decantado ou o filtrado, enquanto for necessário. Pode utilizar-se até 100 ml deste tipo de inóculo para cada litro de meio.

▼B

As águas superficiais constituem uma fonte adicional de inóculo. Nesse caso, recolher uma amostra de uma água superficial adequada, por exemplo, dos rios ou dos lagos e conservá-la em estado aeróbio enquanto for necessário. Se tal se justificar, concentrar o inóculo por filtração ou por centrifugação.

I.6.5. **Pré-condicionamento dos inóculos**

Os inóculos podem ser pré-condicionados para as condições experimentais mas não podem ser pré-adaptados à substância química de ensaio. O pré-condicionamento consiste em arejar as lamas activadas em meio mineral ou efluente secundário durante cinco a sete dias, à temperatura de ensaio. Por vezes, o pré-condicionamento melhora a precisão dos métodos de ensaio pelo facto de reduzir os valores dos brancos. É desnecessário pré-condicionar o inóculo para o método de MITI.

I.6.6. **Controlos abióticos**

Sempre que necessário, verificar a possível degradação abiótica da substância de ensaio, determinando a remoção do COD, o consumo de oxigénio ou a libertação de dióxido de carbono em controlos estéreis que não contenham inóculo. Esterilizar por filtração através de uma membrana (0,2 - 0,45 mícron) ou adicionando uma substância tóxica adequada numa concentração conveniente. Se é usada membrana de filtração, colhem-se as amostras assepticamente para que se mantenha a esterilidade. A menos que se tenha excluído previamente a adsorção da substância de ensaio, os testes para a medição da biodegradação por remoção do COD, especialmente com inóculo de lamas activas, deverão incluir um controlo abiótico, o qual é inoculado e contaminado.

I.6.7. **Número de frascos**

O número de frascos numa experiência-tipo é descrito nos títulos de cada ensaio.

Podem usar-se os seguintes tipos de frascos:

— suspensão de ensaio: substância de ensaio e inóculo,

— branco de inóculo: somente o inoculo,

— controlo do processo: substância de referência e inóculo,

— controlo abiótico estéril: substância de ensaio, estéril (ver ponto I.6.6),

— controlo de adsorção: substância de ensaio, inóculo e agente esterilizante,

— controlo de toxicidade: substância de ensaio, substância de referência e inóculo.

As determinações na suspensão de ensaio e no branco do inóculo deverão obrigatoriamente ser feitas em paralelo. É também aconselhável fazer as determinações noutro frasco, em paralelo.

Todavia, isto nem sempre é possível. Garantir que são preparadas amostras suficientes ou efectuadas leituras suficientes de modo que possa avaliar-se a remoção percentual no período dos 10 dias.

▼B

I.7. RESULTADOS E AVALIAÇÃO

No cálculo do valor D_t, degradação percentual, utilizam-se os valores médios das medições em duplicado dos parâmetros tanto nos recipientes de ensaio como no branco do inóculo. As fórmulas são apresentadas a seguir, nas secções correspondentes sobre os ensaios específicos. A evolução da degradação é representada graficamente, sendo indicado o período dos 10 dias. Calcular e registar a remoção percentual alcançada no final do período dos 10 dias e o valor no patamar ou no final do ensaio, conforme o caso.

Nos ensaios respirométricos os compostos que contêm azoto podem afectar o consumo de oxigénio, devido a fenómenos de nitrificação (ver os apêndices 2 e 5).

I.7.1. **Degradação medida através da determinação do COD**

Para o cálculo da percentagem de degradação (D_t), é colhida uma amostra num dado momento, o qual deverá ser calculado separadamente para cada um dos frascos que contêm a substância a testar, usando os valores médios das medições em duplicado do COD, com o fim de se poder avaliar a validade do teste (ver ponto I.5.2). Para o cálculo usa-se a seguinte equação:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{b0}}\right) \times 100$$

em que:

D_t = % de degradação no momento t,

C_o = concentração média inicial de COD no meio de cultura inoculado que contém a substância de ensaio (mg de COD/l),

C_t = concentração média de COD no meio de cultura inoculado que contém a substância de ensaio, no momento t (mg de COD/l),

C_{bo} = concentração média inicial de COD no branco de meio mineral inoculado (mg de COD/l),

C_{bt} = concentração média de COD no branco de meio mineral inoculado no momento t (mg de COD/l).

Todas as concentrações são medidas experimentalmente.

I.7.2. **Degradação medida através de análise específica**

No caso de existirem dados analíticos específicos, calcular a biodegradação primária pela fórmula:

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

em que:

D_t = % de degradação no momento t, normalmente após 28 dias,

S_a = quantidade residual de substância de ensaio no meio inoculado no final do ensaio (mg),

S_b = quantidade residual de substância de ensaio no teste em branco que utiliza água/meio a que apenas se adicionou a substância de ensaio (mg).

▼B

I.7.3. **Degradação abiótica**

Quando é usado um controlo estéril abiótico, usa-se para o cálculo da percentagem de degradação abiótica, a fórmula seguinte:

$$\% \text{ de degradação abiótica} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

em que:

$C_{s(o)}$ = concentração COD no controlo estéril no dia zero,

$C_{s(t)}$ = concentração COD no controlo estéril no dia t.

I.8. RELATÓRIO

O relatório de ensaio deverá conter, se possível, as informações seguintes:

— substâncias químicas de ensaio e de referência e o seu grau de pureza,

— condições de ensaio,

— inóculo: natureza e locais de amostragem, concentração e qualquer tratamento de pré-condicionamento,

— proporção e natureza dos resíduos industriais existentes nas águas residuais, se forem conhecidas,

— duração e temperatura do ensaio,

— nos casos das substâncias químicas de ensaio pouco solúveis, qual o tratamento efectuado,

— método de ensaio aplicado; deverão ser apresentadas e explicadas as razões científicas de qualquer modificação de procedimento,

— folha de dados,

— qualquer fenómeno de inibição observado,

— qualquer degradação abiótica observada,

— dados analíticos químicos específicos, se os houver,

— dados analíticos químicos sob intermediários, se os houver,

— o gráfico da degradação percentual em função do tempo para as substâncias de ensaio e de referência, a fase de latência, a fase de degradação, o período dos 10 dias e o declive, deverão ser claramente indicados (apêndice 1). Se o teste foi sujeito a um critério de validade, as percentagens médias de degradação nos frascos com a substância de ensaio podem ser usadas para o gráfico,

— a remoção percentual depois do período dos 10 dias, e no patamar ou no final do ensaio.

PARTE II. **ENSAIO DA REDUÇÃO GRADUAL DO COD** (método C.4-A)

II.1. PRINCÍPIO DO MÉTODO

Ao abrigo da luz ou sob luz difusa e à temperatura de 22 ± 2 °C faz-se o arejamento de um determinado volume de meio mineral inoculado, contendo uma concentração conhecida da substância de ensaio (10-40 mg COD/l) como única fonte nominal de carbono orgânico.

▼B

Acompanha-se a degradação por análise frequente do COD ao longo de um período de 28 dias. Calcula-se o grau de biodegradação, exprimindo a concentração de COD removido (corrigida em função do branco de inóculo de controlo) em percentagem da concentração inicialmente presente. O grau de biodegradação primária também pode ser calculado através de uma análise química complementar efectuada no início e no fim da incubação.

II.2. DESCRIÇÃO DO MÉTODO

II.2.1. **Equipamento**

a) Frascos cónicos, por exemplo, com capacidade entre 250 ml e 2 1, consoante o volume necessário para a análise do COD;

b) Máquina agitadora — para os frascos cónicos, com controlo automático de temperatura ou, em alternativa, utilizada a uma temperatura ambiente constante, e com potência suficiente para manter condições aeróbias em todos os frascos;

c) Equipamento de filtração, com membranas adequadas;

d) Analisador de COD;

e) Equipamento para determinar o oxigénio dissolvido;

f) Centrifugadora.

II.2.2. **Preparação do meio mineral**

Para a preparação da solução de reserva, ver ponto I.6.2.

Misturar 10 ml de solução (a) com 800 ml de água de diluição, adicionar 1 ml das soluções (b) a (d) e ajustar o volume a 1 litro com água de diluição.

II.2.3. **Preparação e pré-condicionamento do inóculo**

O inóculo pode ser obtido de várias origens: lamas activadas; efluentes de esgotos; águas de superfície; solos ou misturas destes.

Ver pontos I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 e 1.6.5.

II.2.4. **Preparação dos frascos**

A título de exemplo, introduzir quantidades de 800 ml de meio mineral em frascos cónicos com a capacidade de 2 litros e adicionar volumes suficientes das soluções de reserva que contêm as substâncias de ensaio e de referência a frascos separados, para se obter uma concentração de substância química equivalente a 10-40 mg de COD/l. Controlar os valores do pH e ajustá-los, se necessário, para 7,4. Inocular os frascos com lamas activadas ou com outra fonte de inóculos (ver ponto I.6.4), para se obter uma concentração final não superior a 30 mg de sólidos em suspensão/l. Preparar também os controlos de inóculo em meio mineral mas sem a substância química de ensaio ou de referência.

Se necessário, utilizar um recipiente para verificação do possível efeito inibidor da substância química de ensaio, inoculando uma solução que contenha, num meio mineral, concentrações comparáveis das substâncias químicas de ensaio e de referência.

Ainda no caso de ser necessário, preparar outro frasco estéril para verificar se a substância química de ensaio se degrada abioticamente, utilizando uma solução não inoculada contendo a substância química (ver ponto I.6.6).

▼B

Para além disso, no caso de se suspeitar que a substância química de ensaio é significativamente adsorvida pelo vidro, lamas, etc., efectuar uma avaliação preliminar para se determinar o grau provável da adsorção e, consequentemente, se determinar se o ensaio é adequado à substância química (ver quadro 1). Preparar um frasco com a substância de ensaio, o inóculo e o agente esterilizante.

Ajustar os volumes em todos os frascos a 1 litro, utilizando meio mineral e, depois de se misturar, retirar uma amostra de cada frasco para determinar a concentração inicial de COD (ver apêndice 2.4). Tapar as aberturas dos frascos, por exemplo com folha de alumínio, de modo a permitir a permuta livre de ar entre o frasco e a atmosfera envolvente. Colocar depois os recipientes na máquina agitadora e iniciar o ensaio.

II.2.5. **Número de frascos numa experiência-tipo**

De preferência:

Frascos 1 e 2: suspensão de ensaio;

Frascos 3 e 4: branco do inóculo;

Frasco 5: controlo.

Se necessário, ainda:

Frasco 6: controlo abiótico estéril;

Frasco 7: controlo da adsorção;

Frasco 8: controlo da toxicidade.

Ver ponto I.6.7.

II.2.6. **Realização do ensaio**

Ao longo do ensaio, determinar as concentrações de COD em cada frasco em duplicado, a intervalos de tempo conhecidos suficientemente frequentes que permitam determinar o início do período dos 10 dias e a remoção percentual no final do período dos 10 dias. Utilizar apenas o volume mínimo de suspensão de ensaio necessário para cada determinação.

Antes da colheita de amostras, repor as perdas dos frascos por evaporação, adicionando água de diluição (ponto I.6.1) na quantidade requerida, se for necessário. Homogeneizar o meio de cultura antes de se retirar a amostra e garantir que o material aderente às paredes dos recipientes é dissolvido ou se mantém em suspensão antes da colheita de amostras. Filtrar através de membranas ou centrifugar (ver apêndice 2.4), imediatamente após a colheita de amostras. Analisar no mesmo dia as amostras filtradas ou centrifugadas ou, caso contrário, armazená-las à temperatura de 2-4°C durante um período máximo de 48 horas, ou a uma temperatura inferior a - 18°C no caso de um período mais longo.

II.3. RESULTADOS E RELATÓRIO

II.3.1. **Tratamento dos resultados**

Calcular a percentagem de degradação no momento t conforme referido no ponto I.7.1 (determinação do COD) e, facultativamente, conforme referido no ponto I.7.2 (análise específica).

Registar todos os resultados nas folhas de dados fornecidas.

▼B

II.3.2. **Validade dos resultados**

Ver ponto I.5.2.

II.3.3. **Relatório**

Ver ponto I.8.

II.4. FOLHA DE DADOS

Como exemplo de folha de dados apresenta-se a seguinte:

ENSAIO DE REDUÇÃO GRADUAL DO COD

1. **LABORATÓRIO**

2. **DATA DO INÍCIO DO ENSAIO**

3. **SUBSTÂNCIA DE ENSAIO**

Nome:

Concentração da solução de reserva: ... mg/l da substância

Concentração inicial no meio, t_o: ... mg/l da substância

4. **INÓCULO**

Origem:

Tratamento efectuado:

Pré-condicionamento, se o houver:

Concentração das substâncias sólidas em suspensão na mistura reaccional: mg/l

5. **DETERMINAÇÕES DE CARBONO**

Analisador de carbono:

	Nº do frasco		COD decorridos n dias (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Substância química de ensaio e inóculo	1	a_1					
		a_2					
		a, média $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, média $C_{b(t)}$					

▼B

	Nº do frasco		COD decorridos n dias (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Branco de inóculo sem substância de ensaio	3	c_1					
		c_2					
		c, média $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, média $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **AVALIAÇÃO DOS DADOS BÁSICOS**

Nº do frasco		% de degradação decoridos n dias				
		0	n_1	n_2	n_3	n_4
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
Média (*)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(*) D_1 e D_2 não devem ser ponderados, se há uma diferença considerável.

Nota: É possível utilizar fórmulas idênticas para a substância química de referência e para os controlos de toxicidade.

7. **CONTROLO ABIÓTICO** (facultativo)

	Tiempo (días)	
	0	t
conc. de COD (mg/l) en el control estéril	$C_{s(o)}$	$C_{s(t)}$

$$\% \text{ de degradação abiótica} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. **ANÁLISE QUÍMICA ESPECÍFICA** (facultativa)

	Quantidade residual da subastância de ensaio no final do teste (mg/l)	% degradação
Controlo estéri	S_b	

▼B

	Quantidade residual da substância de ensaio no final do teste (mg/l)	% degradação
Meio de ensaio inoculado	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

PARTE III. **TESTE DE DESPISTE DA OCDE MODIFICADO** (método C.4-B)

III.1. PRINCÍPIO DO MÉTODO

Utilizando 0,5 ml de efluente por litro de meio faz-se a inoculação de um determinado volume de meio mineral, contendo uma concentração conhecida da substância de ensaio (10-40 mg de COD/l) como única fonte nominal de carbono orgânico. Faz-se o arejamento da mistura ao abrigo da luz ou sob luz difusa, à temperatura de 22 ± 2°C.

Acompanha-se a degradação por análise frequente do COD ao longo de um período de 28 dias. Calcula-se o grau de biodegradação, exprimindo a concentração de COD removido (corrigida em função do branco de inóculo de controlo) em percentagem da concentração inicialmente presente. O grau de biodegradação primária também pode ser calculado através de uma análise química complementar efectuada no início e no fim da incubação.

III.2. DESCRIÇÃO DO MÉTODO

III.2.1. Equipamento

a) Frascos cónicos, por exemplo, com capacidade entre 250 ml e 2 l, consoante o volume necessário para a análise do COD;

b) Máquina agitadora — para os frascos cónicos, com controlo automático de temperatura ou, em alternativa, utilizada a uma temperatura ambiente constante, e com potência suficiente para manter condições aeróbias em todos os frascos;

c) Equipamento de filtração, com membranas adequadas;

d) Analisador de COD;

e) Equipamento para determinar o oxigénio dissolvido;

f) Centrifugadora.

III.2.2. **Preparação do meio mineral**

Para a preparação da solução de reserva, ver ponto I.6.2.

Misturar 10 ml de solução (a) com 800 ml de água de diluição, adicionar 1 ml das soluções (b) a (d) e ajustar o volume a 1 litro com a água de diluição.

Neste método utiliza-se como inóculo apenas 0,5 ml de efluente/litro pelo que pode ser necessário reforçar o meio com oligoelementos e factores de crescimento. Esta operação efectua-se adicionando 1 ml de cada uma das soluções a seguir indicadas por litro de meio final.

▼B

Solução de oligoelementos:

Sulfato de manganés tetrahidratado, $MnSO_4 . 4H_{20}$	39,9 mg
Ácido bórico, H_3BO_3	57,2 mg
Sulfato de zinco heptahidratado, $ZnSO_4 . 7H_{20}$	42,8 mg
Heptamolibdato de amónio, $(NH_4)_6 Mo_7O_{24}$	34,7 mg
Quelato de Fe ($FeCl_3$ — ácido etilenodiaminatetracético)	100,0 mg
Dissolver e ajustar o volume a 1 000 ml com água de diluição	

Solução vitamínica:

Extracto de levedura	15,0 mg

Dissolver o extracto de levedura em 100 ml de água. Esterilizar, fazendo passar através de uma membrana de 0,2 mícron ou preparar de fresco.

III.2.3. **Preparação e pré-condicionamento do inóculo**

O inóculo é derivado de um efluente secundário de uma estação de tratamento ou laboratório, que recebe predominantemente esgotos domésticos. Ver pontos I.6.4.2 e I.6.5.

Utiliza-se 0,5 ml por litro de meio mineral.

III.2.4. **Preparação dos frascos**

A título de exemplo, introduzir quantidades de 800 ml de meio mineral em frascos cónicos com a capacidade de 2 litros e adicionar volumes suficientes das soluções de reserva que contêm as substâncias de ensaio e de referência a frascos separados, para se obter uma concentração de substância química equivalente a 10-40 mg de COD/l. Controlar o valor do pH e ajustá-lo, se necessário, para 7,4. Inocular os frascos com efluente de águas residuais para se obter uma concentração de 0,5 ml/litro (ver ponto I.6.4.2). Preparar também os controlos de inóculo em meio mineral mas sem a substância química de ensaio ou de referência.

Se necessário, utilizar um recipiente para verificação do possível efeito inibidor da substância química do ensaio, inoculando uma solução que contenha, num meio mineral, concentrações comparáveis das substâncias químicas de ensaio e de referência.

Ainda se necessário, preparar outro frasco estéril para verificar se a substância química de ensaio se degrada abioticamente, utilizando uma solução não inoculada contendo a substância química (ver ponto 1.6.6).

Para além disso, no caso de se suspeitar que a substância química de ensaio é significativamente adsorvida pelo vidro, lamas, etc., efectuar uma avaliação preliminar para se determinar o grau provável de adsorção e, consequentemente, se determinar se o ensaio é adequado à substância química (ver quadro 1). Preparar um frasco com a substância de ensaio, o inóculo e o agente esterilizante.

Ajustar os volumes em todos os frascos a 1 litro, utilizando meio mineral e, depois de se misturar, retirar uma amostra de cada frasco para determinar a concentração inicial de COD (ver apêndice 2.4). Tapar as aberturas dos frascos, por exemplo com folha de alumínio, de modo a permitir a permuta livre de ar entre o frasco e a atmosfera envolvente. Colocar depois os recipientes na máquina agitadora e iniciar o ensaio.

▼B

III.2.5. **Número de frascos numa experiência-tipo**

De preferência:

Frascos 1 e 2: suspensão de ensaio,

Frascos 3 e 4: branco do inóculo,

Frasco 5: controlo;

Se necessário, ainda:

Frasco 6: controlo abiótico estéril, Frasco 7: controlo da adsorção,

Frasco 8: controlo da toxicidade.

Ver ainda o ponto I.6.7.

III.2.6. **Realização do ensaio**

Ao longo do ensaio, determinar as concentrações de COD em cada frasco em duplicado, a intervalos de tempo conhecidos suficientemente frequentes que permitam determinar o início do período dos 10 dias e a remoção percentual no final do período dos 10 dias. Utilizar apenas o volume mínimo de suspensão de ensaio necessário para cada determinação.

Antes da colheita de amostras, repor as perdas dos frascos por evaporação, adicionando água de diluição (ponto I.6.1) na quantidade requerida, se for necessário. Homogeneizar o meio de cultura antes de se retirar a amostra e garantir que o material aderente às paredes dos recipientes é dissolvido ou se mantém em suspensão antes da colheita de amostras. Filtrar através de membranas ou centrifugar (ver apêndice 2.4), imediatamente após a colheita de amostras. Analisar no mesmo dia as amostras filtradas ou centrifugadas ou, caso contrário, armazená-las à temperatura de 2-4°C durante um período máximo de 48 horas, ou a uma temperatura inferior a — 18°C no caso de um período mais longo.

III.3. RESULTADOS E RELATÓRIO

III.3.1. **Tratamento dos resultados**

Calcular a percentagem de degradação no momento t conforme referido no ponto I.7.1 (determinação do COD) e, facultativamente, conforme referido no ponto I.7.2 (análise específica).

Registar todos os resultados nas folhas de dados fornecidas.

III.3.2. Validade dos resultados

Ver ponto I.5.2.

III.3.3. Relatório

Ver ponto I.8.

III.4. FOLHA DE DADOS

Como exemplo de folha de dados apresenta-se a seguinte:

ENSAIO DE DESPISTE DA OCDE MODIFICADO

1. **LABORATÓRIO**

2. **DATA DO INÍCIO DO ENSAIO**

▼B

3. **SUBSTÂNCIA DE ENSAIO**

Nome:

Concentração da solução de reserva: mg/l da substância

Concentração inicial no meio, t_o:mg/l da substância

4. **INÓCULO**

Origem:

Tratamento efectuado:

Pré-condicionamento, se o houver:

Concentração das substâncias sólidas em suspensão na mistura reaccional: mg/l

5. DETERMINAÇÕES DE CARBONO

Analisador de carbono:

	Nº do frasco		COD decorridos n dias (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Substância química de ensaio e inóculo	1	a_1					
		a_2					
		a, média $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, media $C_{b(t)}$					
Branco de inóculo sem substância de ensaío	3	c_1					
		c_2					
		c, media $C_{b(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, media $C_{b(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **AVALIAÇÃO DOS DADOS BÁSICOS**

Nº do frasco		% de degradação decorridos n dias				
		0	n_1	n_2	n_3	n_4
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				

▼B

Nº do frasco		% de degradação decorridos n dias				
		0	n_1	n_2	n_3	n_4
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
Média (*)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(*) D_1 e D_2 não devem ser ponderados, se há uma diferença considerável.

Nota: É possível utilizar fórmulas idênticas para a substância química de referência e para os controlos de toxicidade.

7. **CONTROLO ABIÓTICO** (facultativo)

	Tempo (dias)	
	0	t
Concentração do COD (mg/l) no controlo estéril	$C_{s(o)}$	$C_{s(t)}$

$$\% \text{ de degradação abiótica} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. **ANÁLISE QUÍMICA ESPECÍFICA** (facultativa)

	Quantidade residual da substância de ensaio no final do teste	% degradação primária
Controlo estéril	S_b	
Meio de ensaio inoculado	S^a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

PARTE IV. ENSAIO DA LIBERTAÇÃO DE CO_2 (método C.4-C)

IV.1. PRINCÍPIO DO MÉTODO

às escuras ou sob luz difusa faz-se passar um caudal controlado de ar isento de dióxido de carbono, para o arejamento de um volume determinado de meio mineral inoculado, contendo uma concentração conhecida da substância química de ensaio (10-20 mg de COD ou de COT/l) como única fonte nominal de carbono orgânico. Acompanha-se a degradação ao longo de 28 dias, determinando o dióxido de carbono produzido, o qual é retido em hidróxido de bário ou em hidróxido de sódio e é medido por titulação do hidróxido residual ou na forma de carbono inorgânico. A quantidade de dióxido de carbono produzido pela substância química de ensaio (corrigida em função dos valores obtidos a partir do branco de inóculo) exprime-se em percentagem do valor CO_2Te. O grau de biodegradação também pode ser calculado por uma análise complementar do COD efectuada no início e no fim da incubação.

▼B

IV.2. DESCRIÇÃO DO MÉTODO

IV.2.1. **Equipamento**

a) Frascos de 2-5 litros, cada um deles munido de um tubo de arejamento que atinge as proximidades do fundo do recipiente e com uma abertura de saída;

b) Agitadores magnéticos, quando se fizer a avaliação de substâncias químicas pouco solúveis;

c) Frascos de absorção de gás;

d) Dispositivo para controlar e medir o fluxo de ar;

e) Equipamento para remoção do dióxido de carbono, para obtenção de ar isento de dióxido de carbono; em alternativa, utilizar uma mistura de oxigénio isento de CO_2 e de azoto isento de CO_2, provenientes de garrafas, nas proporções correctas (20 % de O_2: 80 % de N_2);

f) Dispositivo para a determinação do dióxido de carbono, recorrendo a titulação (volumetria) ou utilizando algum tipo de analisador do carbono inorgânico;

g) Dispositivo de filtração por membranas (facultativo);

h) Analisador de COD (facultativo).

IV.2.2. **Preparação do meio mineral**

Para a preparação das soluções de reserva ver ponto I.6.2.

Misturar 10 ml de solução (a) com 800 ml de água de diluição, adicionar 1 ml das soluções (b) a (d) e ajustar o volume a 1 litro com água de diluição.

IV.2.3. **Preparação e pré-condicionamento do inóculo**

O inóculo pode ser obtido de várias origens: lamas activadas; efluentes de esgotos; águas de superfície; solos ou misturas destes.

Ver pontos I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 e I.6.5.

IV.2.4. **Preparação dos frascos**

A título de exemplo, os volumes e massas a seguir indicados representam valores para frascos de 5 litros que contenham 3 litros de suspensão. No caso de se utilizarem volumes menores, modificar os correspondentes valores em conformidade mas garantir que o dióxido de carbono formado possa ser medido com exactidão.

A cada frasco de 5 litros adicionar 2 400 ml de meio mineral. Adicionar um volume adequado das lamas activadas preparadas (ver ponto I.6.4.1 e I.6.5) para se obter uma concentração de substâncias sólidas em suspensão não superior a 30 mg/l, no volume final de 3 l de mistura inoculada. Em alternativa, diluir primeiro as lamas preparadas, de modo a obter-se uma suspensão de 500-1 000 mg/l em meio mineral, antes de se adicionar uma alíquota ao conteúdo do balão de 5 litros, de modo a obter-se uma concentração de 30 mg/l; esta operação garante uma grande precisão. É possível utilizar outras fontes de inóculo (ver ponto I.6.4.2).

Arejar estas misturas inoculadas, utilizando ar isento de CO_2, durante a noite, para purgar o dióxido de carbono do sistema.

▼B

Adicionar a substância de ensaio e a substância de referência, separadamente, a partir de volumes conhecidos das soluções de reserva, a frascos idênticos repetidos, para se obterem concentrações, modificadas pelas substâncias químicas adicionadas, de 10 a 20 mg de COD ou de COT/l; não adicionar substâncias químicas a alguns dos frascos para serem utilizados como controlos do inóculo. Adicionar as substâncias químicas de ensaio pouco solúveis directamente aos frascos, tomando como base a sua massa ou volume, ou proceder conforme descrito no apêndice 3.

Se necessário, utilizar um frasco para verificar o possível efeito inibidor da substância química de ensaio, adicionando as substâncias químicas de ensaio e de referência nas mesmas concentrações dos outros frascos.

Se necessário, utilizar também um frasco estéril para verificar se a substância química de ensaio se degrada abioticamente, utilizando uma solução não inoculada da substância química (ver ponto I.6.6.). Esterilizar adicionando urna substância tóxica numa concentração adequada.

Ajustar os volumes das suspensões em todos os frascos a 3 litros, adicionando meio mineral previamente arejado com ar isento de CO_2. Facultativamente, podem retirar-se amostras para análise do COD (ver apêndice 2.4) e/ou para análises específicas. Ligar os recipientes de absorção às saídas de ar dos frascos.

No caso de se utilizar hidróxido de bário, ligar em série três frascos de absorção, contendo cada um 100 ml de uma solução de hidróxido de bário 0,0125 M, a cada frasco de 5 litros. A solução deve estar isenta de sulfatos e carbonatos precipitados e a sua concentração deve ser determinada imediatamente antes da utilização. No caso de se utilizar hidróxido de sódio, ligar dois frascos colectores, actuando o segundo como elemento de controlo para demonstrar que todo o dióxido de carbono foi absorvido no primeiro. Nos frascos de absorção as rolhas de frascos de soro são adequadas. Adicionar 200 ml de uma solução de hidróxido de sódio 0,05 M a cada frasco, quantidade que é suficiente para absorver a quantidade total de dióxido de carbono libertado até à degradação completa da substância química de ensaio. A solução de hidróxido de sódio, ainda que recentemente preparada, conterá vestígios de carbonatos; efectua-se a correcção correspondente, deduzindo os carbonatos do branco.

IV.2.5. **Número de frascos numa experiência-tipo**

Balão 1 e 2: suspensão de ensaio;

Balão 3 e 4: branco do inóculo;

Frasco 5: controlo.

De preferência e se necessário, ainda:

Frasco 6: controlo abiótico estéril;

Frasco 7: controlo da toxicidade.

Ver também ponto I.6.7.

IV.2.6. **Realização do ensaio**

Iniciar o ensaio fazendo borbulhar ar isento de CO_2 nas suspensões, com um caudal de 30-100 ml/minuto. Retirar periodicamente amostras do absorvente do dióxido de carbono, para análise do teor de CO_2. Durante os primeiros 10 dias recomenda-se que as análises sejam feitas de dois em dois ou de três em três dias e, depois, de cinco em cinco dias até ao 28.º dia, de modo que seja possível identificar o período dos 10 dias.

▼B

Ao 28.º dia, retirar amostras (facultativo) para análise do COD e/ou análises específicas, medir o pH das suspensões e adicionar a cada frasco 1 ml de ácido clorídrico concentrado; arejar os frascos durante a noite para remoção do dióxido de carbono existente nas suspensões de ensaio. No 29.º dia efectuar a última análise do dióxido de carbono libertado.

Nos dias das medições de CO_2, desligar o dispositivo de absorção de hidróxido de bário mais próximo do frasco e fazer a titulação da solução de hidróxido, utilizando HCl 0,05 M e fenolftalina como indicador. Deslocar os outros dispositivos de absorção para uma posição mais próxima do frasco e colocar um novo dispositivo de absorção, contendo 100 ml de hidróxido de bário 0,0125 M recente, na extremidade mais afastada da série. Efectuar as titulações conforme necessário, por exemplo, quando se observar uma precipitação substancial no primeiro frasco de absorção e antes que seja evidente qualquer precipitação no segundo ou logo que aí se note uma precipitação fraca. Em alternativa, utilizando NaOH como absorvente, retirar com uma seringa uma pequena amostra (depende das características do analisador de carbono utilizado) da solução de hidróxido de sódio do dispositivo de absorção mais próximo do frasco. Injectar a amostra na zona correspondente ao CI do analisador de carbono para analisar directamente o dióxido de carbono libertado.

Analisar o teor no segundo frasco de absorção apenas no final do ensaio para corrigir qualquer passagem de dióxido de carbono.

IV.3. RESULTADOS E RELATÓRIO

IV.3.1. **Tratamento dos resultados**

A quantidade de CO_2 retida num dispositivo de absorção, quando titulada, é dada por:

$$mgCO_2 = (100 \times C_B - 0{,}5 \times V \times C_A) \times 44$$

em que:

V = volume de HCl utilizado na titulação dos 100 ml existentes no dispositivo de absorção (ml),

C_B = concentração da solução de hidróxido de bário (M),

C_A = concentração da solução de ácido clorídrico (M),

se C_B for 0,0125 M e C_A for 0,05 M, a titulação, para 100 ml de hidróxido de bário, será de 50 ml, e a massa de CO_2 será dada por:

$$\frac{0{,}05}{2} \times 44 \times \text{ml de HCl titulado} = 1{,}1 \times \text{ml HCI}$$

Sendo assim, no caso presente, para se converter o volume de HCl titulado em mg de CO_2 produzido, utiliza-se o factor 1,1.

Calcular a massa do CO_2 produzido a partir do inóculo isolado e a partir do inóculo e da substância química de ensaio, utilizando os respectivos valores de titulação, correspondendo a diferença à massa de CO_2 produzido apenas a partir da substância química de ensaio.

Por exemplo, se o inóculo isoladamente conduzir a uma titulação de 48 ml e o inóculo e a substância química de ensaio conduzirem a uma titulação de 45 ml, então:

CO_2 proveniente do inóculo = 1,1 × (50-48) = 2,2 mg

▼B

CO_2 proveniente do inóculo e da substância química de ensaio = 1,1 × (50-45) = 5,5 mg

pelo que a massa do CO_2 produzido a partir da substância química de ensaio será de 3,3 mg.

A percentagem de biodegradação calcula-se pela expressão:

$$\% \text{ de degradação} = \frac{\text{mg de } CO_2 \text{ produzido} \times 100}{CO_2\text{Te} \times \text{mg substância química de ensaio adicionada}}$$

ou

$$\% \text{ de degradação} = \frac{\text{mg de } CO_2 \text{ produzido} \times 100}{\text{mg de COT adicionado no ensaio} \times 3{,}67}$$

sendo o valor 3,67 o factor de conversão (44/12) de carbono em dióxido de carbono.

Obtém-se a percentagem de degradação decorrido qualquer intervalo de tempo, somando as percentagens de CO_2Te, cujo cálculo foi efectuado em cada um dos dias até ao momento em que se faz a medição.

Para os dispositivos de absorção de hidróxido de sódio, calcular a quantidade de dióxido de carbono produzida, expressa em Cl (mg), multiplicando a concentração de CI no absorvente pelo volume desse absorvente.

Calcular a percentagem de degradação pela expressão:

$$\% \text{ de } CO_2\text{Te} = \frac{\text{mg CI do frasco de ensaio} - \text{mg CI do branco}}{\text{MG COT adicionado como substância química de ensaio}} \times 100$$

Calcular as variações de COD (facultativo) conforme descrito no ponto I.7. Registar este e todos os outros resultados na folha de dados fornecida.

IV.3.2. **Validade dos resultados**

O teor de Cl da suspensão da substância química de ensaio em meio mineral, no início do ensaio, deve ser inferior a 5 % do valor do CT, e a libertação total de CO_2 no branco de inóculo, no final do ensaio, não deve normalmente exceder 40 mg/l de meio. No caso de serem obtidos valores superiores a 70 mg de CO_2/l, deverá fazer-se uma análise crítica dos resultados e da técnica experimental.

Ver também o ponto I.5.2.

IV.3.3. **Relatório**

Ver ponto I.8.

IV.4. FOLHA DE DADOS

Como exemplo de uma folha de dados apresenta-se a seguinte.

ENSAIO DA LIBERTAÇÃO DE DIÓXIDO DE CARBONO

1. **LABORATÓRIO**

2. **DATA DO INÍCIO DO ENSAIO**

3. **SUBSTÂNCIA DE ENSAIO**

Nome:

Concentração da solução de reserva: mg/l da substância

▼B

Concentração inicial no meio: mg/l da substância

C total adicionado ao frasco: mg de C

CO_2Te: mg de CO_2

4. **INÓCULO**

Origem:

Tratamento efectuado:

Pré-condicionamento, se o houver:

Concentração das substâncias sólidas em suspensão na mistura reaccional: mg/l

5. **PRODUÇÃO DE DIÓXIDO DE CARBONO E DEGRADABILIDADE**

Método: $Ba(OH)_2$/NaOH/outro ...

Tempo (dia)	CO_2 formado ensio (mg)		CO_2 formado bianco (mg)		$C0_2$ formado acumulado (mg) (ensaio menos branco)		% de CO_2Te $\frac{CO_2 \text{acumulado}}{ThCO_2} \times 100$		
	1 / 2	média	3 / 4	média	1	2	1	2	média
0									
n_1									
n_2									
n_3									
28									

Nota: Podem ser utilizados esquemas idênticos para a substância química de referência e para os controlos de toxicidade.

6. **ANÁLISE DO CARBONO** (facultativa)

Analisador de carbono:

Tempo (dia)	Branco mg/l	Substância química de ensaio mg/l
0	$C_{b(o)}$	C_o
28 (*)	$C_{b(t)}$	C_t

(*) ou no final da incubação.

▼B

$$\% \text{ de COD removido} = \left(1 - \frac{C_t - C_{b(t)}}{C_o - C_{b(o)}}\right) \times 100$$

7. **DEGRADAÇÃO ABIÓTICA** (facultativo)

$$\% \text{ de degradação abiótica} = \frac{\text{formação de } CO_2 \text{ em frasco estéril decorridos ki dias (mg)}}{CO_2\text{Te (mg)}} \times 100$$

PARTE V. **ENSAIO DE RESPIROMETRIA MANOMÉTRICA** (método C.4-D)

V.1. PRINCÍPIO DO MÉTODO

Agita-se um volume determinado de meio mineral inoculado, contendo uma concentração conhecida da substância química de ensaio (substância de ensaio na concentração de 100 mg/l, para dar pelo menos 50-100 mg de CTeO/l) como única fonte nominal de carbono orgânico, num frasco fechado, a uma temperatura constante (± 1 °C ou mais precisa), durante um período de 28 dias. Determina-se o consumo de oxigénio, medindo a quantidade de oxigénio (produzido electroliticamente) necessária para manter constante o volume de gás no frasco do respirómetro, ou, em alternativa, recorrendo à variação de volume ou de pressão (ou a uma combinação de ambas) no aparelho. O dióxido de carbono libertado é absorvido por uma solução de hidróxido de potássio ou por outro absorvente adequado. A quantidade de oxigénio consumida pela substância química de ensaio (corrigida em função do consumo paralelo do branco de inóculo) exprime-se em percentagem de CTeO ou CQO. Facultativamente, a biodegradação primária também pode ser calculada através de uma análise específica suplementar, efectuada no início e no fim da incubação, e a biodegradação total por análise do COD.

V.2. DESCRIÇÃO DO MÉTODO

V.2.1. **Equipamento**

a) Respirómetro adequado;

b) Controlo de temperatura, a ± 1°C ou mais precisa;

c) Dispositivo de filtração por membranas (facultativo);

d) Analisador de carbono (facultativo).

V.2.2. **Preparação do meio mineral**

Para a preparação das soluções de reserva ver ponto I.6.2.

Misturar 10 ml da solução (a) com 800 ml de água de diluição, adicionar 1 ml das soluções (b) a (d) e ajustar o volume a 1 litro com água de diluição.

V.2.3. **Preparação e pré-condicionamento do inóculo**

O inóculo pode ser obtido de várias origens: lamas activadas; efluentes de esgotos; águas de superfície; solos ou misturas destes.

Ver pontos I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 e I.6.5.

V.2.4. **Preparação dos frascos**

Preparar soluções das substâncias químicas de ensaio e de referência, em lotes separados, em meio mineral, com uma concentração, em geral, de 100 mg de substância química/l, para dar pelo menos 50-100 mg de CTeO/l, utilizando as soluções de reserva.

▼B

Calcular o valor de CTeO com base na formação de sais de amónio, a não ser que se preveja a existência de nitrificação, caso em que o cálculo deverá basear-se na formação de nitrato (ver apêndice 2.2).

Determinar os valores do pH e, se necessário, ajustá-los a 7,4 ± 0,2.

As substâncias pouco solúveis devem ser adicionadas numa fase posterior (ver adiante).

No caso de se pretender determinar a toxicidade da substância química de ensaio, preparar outra solução em meio mineral, contendo as substâncias químicas de ensaio e de referência em concentrações idênticas às das soluções individuais.

Se for necessário efectuar a medição do consumo físico-químico de oxigénio, preparar uma solução da substância química de ensaio, normalmente na concentração de 100 mg de CTeO/l, previamente esterilizada por adição de uma substância tóxica adequada (ver I.6.6).

Introduzir o volume necessário das soluções das substâncias de ensaio e de referência nos frascos correspondentes, pelo menos em duplicado. Adicionar a outros frascos apenas meio mineral (para os controlos de inóculo) e, se necessário, a solução mista das substâncias químicas de ensaio/referência e a solução estéril.

Se a substância química de ensaio for pouco solúvel, adicioná-la directamente nesta fase, tomando como base a massa ou o volume, ou proceder conforme descrito no apêndice 3. Adicionar hidróxido de potássio, grânulos de soda ou outro absorvente aos compartimentos do dispositivo de absorção de CO_2.

V.2.5. **Número de frascos numa experiência-tipo**

De preferência:

Frascos 1 e 2: suspensão de ensaio;

Frascos 3 e 4: branco do inóculo;

Frasco 5: controlo;

Se necessário, ainda:

Frasco 6: controlo abiótico estéril;

Frasco 7: controlo da toxicidade.

Ver também o ponto I.6.7.

V.2.6. **Realização do ensaio**

Deixar que os recipientes atinjam a temperatura desejada e inocular os recipientes adequados com as lamas activadas preparadas ou com outra fonte de inóculo, para se obter uma concentração de substâncias sólidas em suspensão não superior a 30 mg/l. Montar o equipamento, iniciar a agitação, verificar a estanquidade e começar a medir o consumo de oxigénio. Normalmente, não é necessária maior atenção do que efectuar as leituras necessárias e efectuar verificações diárias para se poder actuar no sentido de se manter a temperatura correcta e uma agitação adequada.

Calcular o consumo de oxigénio a partir das leituras efectuadas a intervalos de tempo regulares e frequentes, utilizando os métodos fornecidos pelo fabricante do equipamento. No final da incubação, normalmente decorridos 28 dias, medir o valor do pH do conteúdo dos frascos, especialmente no caso de os consumos de oxigénio serem baixos ou superiores ao valor da $CTeO_{NH4}$ (para os compostos que contêm azoto).

▼B

Se necessário, retirar amostras dos frascos do respirómetro, na fase inicial e na fase final, para análise do COD ou da substância química específica (ver apêndice 2.4). No momento da recolha da amostra inicial, garantir que se conhece o volume da suspensão de ensaio que permanece no frasco. Quando o oxigénio é consumido por uma substância de ensaio que contenha azoto, determinar o acréscimo da concentração de nitrito e de nitrato ao longo de 28 dias e calcular a correcção decorrente do oxigénio consumido por nitrificação (apêndice 5).

V.3. RESULTADOS E RELATÓRIO

V.3.1. **Tratamento dos resultados**

Dividir o consumo de oxigénio (mg) da substância química de ensaio decorrido um determinado período (corrigido em função do branco de inóculo de controlo correspondente ao mesmo período) pela massa da substância química de ensaio utilizada. Deste modo, obtém-se o valor CBO, expresso em mg de oxigénio/mg de substância química de ensaio, ou seja:

$$\text{CBO} = \frac{(\text{mg } O_2 \text{ consumido pela subst. de ensaio} - \text{mg } O_2 \text{ consumido pelo branco})}{(\text{mg de substância de ensaio no frasco})}$$

= mg de O_2 por mg de substância de ensaio no frasco

Calcula-se a percentagem de biodegradação pela expressão:

$$\%\text{ de biodegradação} = \%\text{ CTeO} = \frac{\text{CBO}(\text{mg } O_2/\text{mg de substância química})}{\text{CTeO}(\text{mg } O_2 \text{ de substância química})} \times 100$$

ou pela expressão:

$$\%\text{ CQO} = \frac{\text{CBO}(\text{mg } O_2/\text{mg de substância química})}{\text{CQO}(\text{mg } O_2 \text{ de substância química})} \times 100$$

Note-se que estes dois métodos não conduzirão necessariamente ao mesmo valor, sendo preferível utilizar o primeiro.

Utilizar o valor apropriado da CTeO (NH_4 ou NO_3), consoante se conheça ou se preveja a ocorrência da nitrificação (apêndice 2.2). Se ocorrer nitrificação mas esta não for completa, calcular a correcção decorrente do oxigénio consumido por nitrificação, a partir das variações na concentração de nitrito e nitrato (apêndice 5).

Quando se fazem determinações facultativas de carbono orgânico e/ou de substâncias químicas específicas, calcular a percentagem de degradação conforme descrito no ponto I.7.

Registar todos os resultados nas folhas de dados anexas.

V.3.2. **Validade dos resultados**

O consumo de oxigénio pelo branco de inóculo é, normalmente, de 20-30 mg de O_2/l e não deverá ser superior a 60 mg/l em 28 dias. Os valores superiores a 60 mg/l exigem uma análise crítica dos resultados e das técnicas experimentais. Se o valor do pH estiver fora do intervalo 6-8,5 e se o consumo de oxigénio pela substância química de ensaio for inferior a 60 %, o ensaio deve ser repetido com uma concentração inferior de substância química de ensaio.

Ver também o ponto I.5.2.

▼B

V.3.3. **Relatório**

Ver ponto I.8.

V.4. **FOLHA DE DADOS**

Como exemplo de folha de dados apresenta-se a seguinte:

ENSAIO DE RESPIROMETRIA MANOMÉTRICA

1. **LABORATÓRIO**

2. **DATA DO INÍCIO DO ENSAIO**

3. **SUBSTÂNCIA DE ENSAIO**

Nome:

Concentração da solução de reserva: ... mg/l

Concentração inicial no meio, C_o: ...mg/l

Volume no frasco de ensaio (V): ...ml

CTeO ou CQO: ...mg O_2/mg de substância de ensaio (NH_4, NO_3)

4. **INÓCULO**

Origem: ...

Tratamento efectuado: ...

Pré-condicionamento, se o houver: ...

Concentração das substâncias sólidas em suspensão na mistura reaccional: ...mg/l

5. **CONSUMO DE OXIGÉNIO: BIODEGRADABILIDADE**

		Tempo (días)											
		0		7		14			21			28	
O_2 consumido (mg), substância de ensaio	1												
	2												
	a, média												
O_2 consumido (mg) branco	3												
	4												
	b, média												
CBO corrigida (mg)	$(a_1 - b_m)$												
	$(a_2 - b_m)$												
CBO por mg de substância de ensaio	$\frac{(a_1 - b)}{C_o V}$												
	$\frac{(a_2 - b)}{C_o V}$												

▼B

		Tempo (días)											
		0		7		14			21			28	
% degradação $\frac{CBO}{CTeO} \times 100$	D_1 (a_1)												
	D_2 (a_2)												
	Média (*)												

V = volume de meío no frasco de ensaio.
(*) D_1 e D_2 não devem ser ponderados, se há uma diferença considerável.

N.B: Podem ser utilizados esquemas idênticos para a substância química de referência e para os controlos de toxicidade.

6. **CORRECÇÃO PARA A NITRIF1CAÇÃO** (ver apêndice 5)

Dia		0	28	Diferença
i)	Concentração de nitrato (mg N/l)			(N)
ii)	Equivalente de oxigénio (4,57 X N × V) (mg)	—	—	
iii)	Concentração de nitrito (mg N/l)			(N)
iv)	Equivalente de oxigénio (3,43 × N X V) (mg)	—	—	
ii) + iv)	Total de equivalente de oxigénio	—	—	

7. **ANÁLISE DO CARBONO** (facultativa)

Analisador de carbono:

Tempo (dia)	Branco mg/l	Substância química de ensaio mg/l
0	$C_{b(o)}$	C_o
28 (*)	$C_{b(t)}$	C_t

(*) ou no final da incubação.

$$\% \text{ de COD removido} = \left(1 - \frac{C_t - C_{blt}}{C_o - C_{blo}}\right) \times 100$$

8. **SUBSTÂNCIA QUÍMICA ESPECÍFICA** (facultativo)

S_b = concentração no controlo físico-químico (estéril) decorridos 28 dias,

S_a = concentração no frasco inoculado decorridos 28 dias,

$$\% \text{ de biodegradação} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

9. **DEGRADAÇÃO ABIÓT1CA** (facultativo)

a = consumo de oxigénio em frascos estéreis decorridos 28 dias (mg)

$$\text{consumo de oxigénio por mg de substância química de ensaio} = \frac{a \times 100}{C_o V}$$

▼B

(ver secções 1 e 3),

$$\% \text{ de degradação abiótica} = \frac{a \times 100}{C_o V \times CTeO}$$

PARTE VI. **ENSAIO EM FRASCO FECHADO** (métodoC.4-E)

VI.1. PRINCÍPIO DO MÉTODO

Faz-se a inoculação da solução da substância química de ensaio em meio mineral, normalmente na concentração de 2-5 mg/l, utilizando um número relativamente pequeno de microorganismos provenientes de uma população mista e mantém-se em frascos fechados, completamente cheios, ao abrigo da luz e a uma temperatura constante. Acompanha-se a degradação pela análise do oxigénio dissolvido ao longo de um período de 28 dias. A quantidade de oxigénio consumido pela substância química de ensaio, corrigida em função do consumo paralelo do branco de inóculo, exprime-se em percentagem dos valores CTeO ou CQO.

VI.2. DESCRIÇÃO DO MÉTODO

VI.2.1. **Equipamento**

a) Frascos para CBO com rolhas de vidro, por exemplo, com a capacidade de 250-300 ml;

b) Banho ou incubador, para manter os frascos a uma temperatura constante (± 1°C ou mais precisa), ao abrigo da luz;

c) Frascos de vidro grandes (2-5 1) para a preparação dos meios e para enchimento dos frascos para CBO;

d) Eléctrodo de oxigénio e medidor, ou equipamento e reagentes para a titulação de Winkler.

VI.2.2. **Preparação do meio mineral**

Para a preparação da solução de reserva ver ponto I.6.2.

Misturar 1 ml das soluções (a) a (d) e ajustar o volume a 1 litro com água de diluição.

VI.2.3. **Preparação do inóculo**

O inóculo é normalmente obtido dum efluente secundário duma estação de tratamento ou duma unidade laboratorial, que recebe predominantemente esgotos domésticos. Uma origem alternativa para o inóculo é a água de superfície. Usa-se normalmente de uma gota (0,05 ml) a 5 ml de filtrado por litro de meio. Podem ser necessárias várias tentativas para se descobrir o volume óptimo de dado efluente (ver pontos I.6.4.2 e I.6.5).

VI.2.4. **Preparação dos frascos**

Arejar fortemente o meio mineral durante pelo menos 20 minutos. Efectuar cada série de ensaios com meio mineral proveniente do mesmo lote. De um modo geral, o meio estará pronto para utilização depois de ter estado em repouso durante 20 horas, à temperatura de ensaio. Determinar a concentração do oxigénio dissolvido para efeitos de controlo; esse valor deve ser de aproximadamente 9 mg/l à temperatura de 20 °C. Efectuar todas as operações de transferência e de enchimento de meio saturado com ar sem formação de bolhas, por exemplo, utilizando sifões.

▼B

Paralelamente, preparar outros grupos de frascos para CBO, para a determinação das substâncias químicas de ensaio e de referência em séries experimentais simultâneas. Preparar um número suficiente de frascos para CBO, incluindo os brancos de inóculo, de modo que possam efectuar-se as medições de consumo de oxigénio, pelo menos em duplicado, com os intervalos de ensaio desejados, por exemplo, decorridos 0, 7, 14, 21 e 28 dias. Para se assegurar a identificação do período dos 10 dias, podem ser necessários mais frascos.

Adicionar meio mineral completamente arejado aos frascos grandes de modo que estes fiquem cheios até um terço. Adicionar depois quantidade suficiente das soluções de reserva da substância química de ensaio e da substância química de referência a frascos grandes distintos, de modo que a concentração final das substâncias químicas não seja normalmente superior a 10 mg/l. Não adicionar nenhuma substância química ao branco de controlo do meio, contido noutro frasco grande.

Para não se limitar a actividade do inóculo, garantir que a concentração do oxigénio dissolvido não desça abaixo de 0,5 mg/l nos frascos para CBO. Isto limita a concentração da substância química de ensaio a cerca de 2 mg/l. Contudo, nos casos de compostos dificilmente degradáveis e dos que têm um valor de CTeO baixo, pode prever-se 5-10 mg/l. Em alguns casos, é aconselhável efectuar uma série de experiências paralelas, com a substância química de ensaio em duas concentrações diferentes, por exemplo, 2 e 5 mg/l. Normalmente, calcula-se o valor da CTeO com base na formação de sais de amónio mas, se se souber que há nitrificação ou se esta for previsível, efectua-se o cálculo com base na formação de nitrato ($CTeO_{NO3}$: ver apêndice 2.2). Todavia, havendo nitrificação mas não sendo esta completa, efectua-se a correcção em função das variações da concentração de nitrito e de nitrato, determinadas por análise (ver apêndice 5).

No caso de se pretender investigar a toxicidade da substância química de ensaio (por exemplo, no caso de se ter verificado previamente um fraco valor de biodegradabilidade), é necessária outra série de frascos.

Preparar outro frasco grande para meio mineral arejado (cheio até um terço do seu volume), mais a substância química de ensaio e a substância química de referência com os valores finais de concentração, normalmente idênticos aos dos outros frascos grandes.

Inocular as soluções dos frascos grandes com efluente secundário (uma gota, ou cerca de 0,05 ml, até 5 ml/l) ou de outra origem, tal como a água dos rios (ver ponto I.6.4.2). Finalmente, ajustar o volume das soluções com meio mineral arejado, utilizando um tubo que atinja o fundo do frasco de modo a obter-se uma mistura adequada.

VI.2.5. **Número de frascos numa experiência-tipo**

Numa experiência-tipo utilizam-se os frascos seguintes:

— pelo menos 10 contendo a substância química de ensaio e o inóculo (suspensão de ensaio),

— pelo menos 10 contendo apenas inóculo (branco de inóculo),

— pelo menos 10 contendo a substância química de referência e o inóculo (controlo),

▼B

— e, se necessário, seis frascos contendo a substância química de ensaio, a substância química de referência e o inóculo (controlo de toxicidade). Contudo, para se assegurar a identificação do período dos 10 dias, será necessário utilizar o dobro dos frascos.

VI.2.6. Realização do ensaio

Distribuir imediatamente cada solução preparada pelo respectivo grupo de frascos para CQO, utilizando um tubo que mergulhe até um quarto do fundo (e não no fundo) do frasco grande, de modo que todos os frascos para CQO fiquem completamente cheios. Bater suavemente para remover quaisquer bolhas de ar. Verificar, logo no momento inicial, a existência de oxigénio dissolvido nos frascos, recorrendo a análises, pelos métodos de Winkler ou do eléctrodo. O conteúdo dos frascos pode ser conservado para análise posterior pelo método de Winkler, adicionando sulfato de manganés (II) e hidróxido de sódio (o primeiro é o reagente de Winkler). Armazenar os frascos cuidadosamente tapados, contendo o oxigénio retido na forma de óxido de manganés (III) hidratado, que é castanho, ao abrigo da luz e à temperatura de 10°C-20°C, durante um período inferior a 24 horas, antes de continuar com os outros passos do método de Winkler. Rolhar os restantes frascos em duplicado, garantindo que não contêm bolhas de ar, e incubar à temperatura de 20°C, ao abrigo da luz. Cada série deve ser acompanhada por uma outra série paralela completa, para as determinações no branco de meio inoculado. De cada série, retirar pelo menos dois frascos idênticos para análise do oxigénio dissolvido, a intervalos de tempo regulares (pelo menos semanalmente) durante os 28 dias de incubação.

A amostragem semanal deve permitir avaliar a remoção percentual num período de 14 dias, ao passo que as amostras recolhidas cada três, quatro dias devem permitir identificar o período dos 10 dias, o que exigirá o dobro dos frascos.

Para as substâncias de ensaio que contêm azoto, devem ser feitas correcções que dêem conta do consumo de oxigénio provocado por qualquer fenómeno de nitrificação que possa ocorrer. Para efectuar esta operação, recorrer ao método do eléctrodo de O_2 para a determinação da concentração do oxigénio dissolvido e, depois, retirar uma amostra do frasco para a CBO, para a análise de nitrito e de nitrato. A partir do acréscimo na concentração de nitrito e de nitrato, calcular o oxigénio utilizado (ver apêndice 5).

VI.3. RESULTADOS E RELATÓRIO

VI.3.1. **Tratamento dos resultados**

Calcular primeiro a CBO que se manifesta após cada período, subtraindo a redução de oxigénio (mg de O_2/l) no branco de inóculo do valor determinado para a substância química de ensaio. Dividir esta redução corrigida pela concentração (mg/l) da substância química de ensaio, para se obter o valor CBO específico, em miligrama de oxigénio por miligrama de substância química de ensaio. Calcular a percentagem de biodegradabilidade, dividindo o valor CBO específico pelo valor CTeO específico (calculado em conformidade com o apêndice 2.2) ou pelo valor CQO (determinado por análise, ver apêndice 2.3) ou seja:

$$\text{CBO} = \frac{(\text{mg } O_2 \text{ consumido pela subst. de ensaio} - \text{mg } O_2 \text{ consumido pelo branco})}{(\text{mg de substância de ensaio no frasco})}$$

▼B

= mg de O_2 por mg de substância de ensaio

$$\% \text{ de degradação} = \frac{\text{CBO}(\text{mg } O_2/\text{mg de substância de ensaio})}{\text{CTeO}(\text{mg } O_2/\text{mg de substância de ensaio})} \times 100$$

ou

$$\% \text{ de degradação} = \frac{\text{CBO}(\text{mg } O_2/\text{mg de substância ensaio})}{\text{CQO}(\text{mg } O_2/\text{mg de substância ensaio})} \times 100$$

Note-se que estes dois métodos não conduzirão necessariamente ao mesmo valor, sendo preferível utilizar o primeiro.

Para as substâncias de ensaio que contêm azoto, utilizar os valores CTeO adequados (NH_4 ou NO_3) conforme exista ou se admita que possa ocorrer nitrificação (apêndice 2.2). Se houver nitrificação, não sendo esta completa, calcular a correcção decorrente do oxigénio consumido por nitrificação, a partir da variação na concentração de nitrito e de nitrato (apêndice 5).

VI.3.2. **Validade dos resultados**

A redução do oxigénio no branco de inóculo não deve exceder 1,5 mg de oxigénio dissolvido/l decorridos 28 dias. Valores superiores a esse exigem uma análise cuidadosa das técnicas experimentais. A concentração de oxigénio residual nos frascos de ensaio não deverá descer abaixo de 0,5 mg/litro em nenhuma ocasião. Esses níveis baixos de oxigénio apenas são válidos se o método utilizado para a determinação do oxigénio dissolvido permitir medir tais níveis com exactidão.

Ver também o ponto I.5.2.

VI.3.3. **Relatório**

Ver I.8.

VI.4. FOLHA DE DADOS

Como exemplo de folha de dados apresenta-se a que se segue.

ENSAIO DO FRASCO FECHADO

1. **LABORATÓRIO**

2. **DATA DO INÍCIO DO ENSAIO**

3. **SUBSTÂNCIA DE ENSAIO**

Nome: ...

Concentração da solução de reserva: ... mg/l

Concentração inicial no frasco: ... mg/l

CTeO ou CQO: mg 0_2/mg de substância de ensaio

4. **INÓCULO**

Origem: ...

Tratamento efectuado: ...

▼B

Pré-condicionamento, se o houver: ...

Concentrações das substâncias sólidas em suspensão na mistura reaccional: ... ml/l

5. **DETERMINAÇÕES DO OD**

Método: Winkler/eléctrodo.

Análises em frasco

Tempo de incubação (d)			DO (mg/l)			
			0	n_1	n_2	
Branco (sem substância química)	1	C_1				
	2	C_2				
Média	$m_b = \frac{C_1 + C_2}{2}$					
Substância de ensaio	1	a_1				
	2	a_2				
Média	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$					

NB: Podem ser utilizados esquemas idênticos para a substância química de referência e para os controlos de toxicidade

6. **CORRECÇÃO DEVIDA A NITRIFICAÇÃO** (ver apêndice 5)

Tempo de incubação (d)		0	n_1	n_2	n_3
i)	Concentração de nitrato (mg N/l)				
ii)	Variação na concentração de nitrato (mg N/l)	—			
iii)	Equivalente de oxigénio (mg/l)	—			
iv)	Concentração de nitrito (mg N/l)				
v)	Variação na concentração de nitrito (mg N/l)	—			
vi)	Equivalente de oxigénio (mg/l N/l)	—			
iii) + vi)	Equivalente de oxigénio total (mg/l)	—			

7. **REDUÇÃO DO OD: % DE DEGRADAÇÃO**

	Redução decorridos n dias (mg/l))			
	n_1	n_2	n_3	
Frasco 1: $(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})$				
Frasco 2: $(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})$				

▼B

	Redução decorridos n dias (mg/l))			
	n_1	n_2	n_3	
Frasco 1: $\%\ D_1 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})]}{\text{conc. de ensaio} \times \text{CTeO da subs. quím.}} \times 100$				
Frasco 2: $\%\ D_2 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})]}{\text{conc. de ensaio} \times \text{CTeO da subs. quím}} \times 100$				
$\%\ D\ \text{média}\ (*) = \frac{D_1 - D_2}{2}$				

(*) Não retomar o valor médio, se existirem diferenças consideráveis entre os duplicados.

m_{to} = valor no frasco de ensaio no tempo 0,

m_{tx} = valor no frasco de ensaio no tempo x,

m_{bo} = valor médio do branco no tempo 0,

m_{bx} = valor médio do branco no tempo x.

Aplicar também a correcção decorrente da nitrificação, com base em iii) + vi) da secção 6.

8. **REDUÇÕES DE OD NO BRANCO**

Consumo de oxigénio no branco: (m_{bo} - m_{b28}) mg/l. Este consumo é importante para a validade do ensaio. Deve ser inferior a 1,5 mg/l.

PARTE VII. **ENSAIO DE MITI** (método C.4-F)

VII.1. PRINCÍPIO DO MÉTODO

Mede-se automaticamente a absorção de oxigénio por uma solução ou suspensão agitada, contendo a substância química de ensaio num meio mineral, inoculada com microorganismos inadaptados e especialmente desenvolvidos, durante um período de 28 dias, num respirómetro encerrado, ao abrigo da luz e à temperatura de 25 ± 1°C. A absorção do dióxido de carbono libertado faz-se com cal sódica. Exprime-se a biodegradabilidade pela percentagem do consumo de oxigénio (corrigida em função do consumo do branco) em relação ao consumo teórico (CTeO). Calcula-se também a percentagem de biodegradabilidade primária, a partir de uma análise química específica complementar, efectuada no início e no fim da incubação, por exemplo, por análise do COD.

VII.2. DESCRIÇÃO DO MÉTODO

VII.2.1. **Equipamento**

a) Medidor de CBO electrolítico automático ou respirómetro, normalmente equipado com seis frascos de 300 ml cada um e também equipado com recipientes para o absorvente de CO_2;

▼B

b) Sal. de temperatura constante e/ou banho à temperatura de 25 ± 1°C ou mais precisa;

c) Dispositivo de filtração por membranas (facultativo);

d) Analisador de carbono (facultativo).

VII.2.2. **Preparação do meio mineral**

Preparar as seguintes soluções de reserva, utilizando reagentes de qualidade analítica e água (ponto I.6.1):

a) Dihidrogeno-ortofosfato monopotássico, KH_2PO_4 8,50 g

Monohidrogeno-ortofosfato dipotássico, K_2HPO_4 21,75 g

Monohidrogeno-ortofosfato dissódico dodecahidratado, Na_2HPO_4 12 H_2O 44,60 g

Cloreto de amónio, NH_4Cl 1,70 g

Dissolver em água e ajustar o volume a 1 litro.

O valor do pH da solução deve ser de 7,2;

b) Sulfato de magnésio heptahidratado, $MgSO_4$ 7 H_2O 22,50 g

Dissolver em água e ajustar o volume a 1 litro;

c) Cloreto de cálcio anidro, $CaCl_2$ 27,50 g

Dissolver em água e ajustar o volume a 1 litro;

d) Cloreto de ferro (III) hexahidratado, $FeCl_3$. 6 H_2O 0,25 g

Dissolver em água e ajustar o volume a 1 litro.

Retirar 3 ml de cada uma das soluções a), b), c) e d) e ajustar o volume a 1 litro.

VII.2.3. **Preparação do inóculo**

Recolher amostras recentes em pelo menos dez locais, sobretudo em áreas onde sejam utilizados e descarregados diversos produtos químicos. Em locais tais como as estações de tratamento de águas residuais, estações de tratamento de esgotos industriais, rios, lagos, mar, recolher 1 litro de amostras de lamas, solo superficial, água, etc., e misturar tudo muito bem. Após a remoção dos materiais flutuantes, deixar repousar e ajustar o pH do sobrenadante a 7 ± 1, utilizando hidróxido de sódio ou ácido fosfórico.

Utilizar um volume adequado de sobrenadante filtrado para encher um recipiente próprio para lamas activadas com dispositivo de enchimento e esvaziamento. Arejar o líquido durante cerca de 23,5 horas. Trinta minutos após a interrupção do arejamento, rejeitar cerca de um terço do volume total do sobrenadante e adicionar igual volume de uma solução (pH 7) contendo glucose, peptona e ortofosfato monopotássico de concentração 0,1 % em qualquer destes componentes, ao material sedimentado, e recomeçar o processo de arejamento. Repetir este procedimento uma vez por dia. A unidade de lamas deve operar de acordo com as seguintes boas práticas: os efluentes deverão ser límpidos, a temperatura deverá ser mantida a 25 ± 2 °C e o pH deverá ser 7 ± 1, a sedimentação das lamas deverá ser boa, arejamento suficiente para manter a mistura permanentemente em condições aeróbias, presença de protozoários, devendo testar-se a actividade das lamas por comparação com uma substância de referência, pelo menos cada três meses. Não utilizar lamas como inóculo sem que tenha decorrido pelo menos um mês de operação, mas não mais do que quatro meses. Seguidamente, colher amostras em pelo menos 10 locais a intervalos regulares, uma vez em cada três meses.

▼B

Para se manter a mesma actividade nas lamas frescas e nas antigas, misturar o sobrenadante filtrado de lamas activadas em utilização com igual volume de sobrenadante filtrado de uma mistura recentemente obtida a partir de dez origens e fazer a cultura do caldo combinado conforme anteriormente descrito. Recolher as lamas para utilização como inóculo decorridas 18-24 horas sobre a alimentação da unidade de lamas.

VII.2.4. **Preparação dos frascos**

Preparar os seis frascos seguintes:

N.º 1: substância química de ensaio em água de diluição, a 100 mg/l

N.os 2, 3 e 4: substância química de ensaio em meio mineral, a 100 mg/l

N.º 5: substância química de referência (por exemplo, anilina) em meio mineral, a 100 mg/l

N.º 6: apenas meio mineral

Adicionar directamente as substâncias químicas de ensaio pouco solúveis, com base na sua massa ou volume ou proceder conforme descrito no apêndice 3, com a excepção de não ser conveniente utilizar nem solventes nem agentes emulsionantes. Adicionar o absorvente de CO_2 a todos os frascos, colocando-o nos recipientes especiais existentes. Ajustar o valor do pH a 7,0, nos frascos n.os 2, 3 e 4.

VII.2.5. **Realização do ensaio**

Inocular os frascos n.os 2, 3 e 4 (suspensões de ensaio), n.º 5 (controlo de actividade) e n.º 6 (branco de inóculo) com um pequeno volume de inóculo, para se obter uma concentração de sólidos em suspensão de 30 mg/l. Não se adiciona nenhum inóculo ao frasco n.º 1, que serve como controlo abiótico. Montar o equipamento, verificar a sua estanquidade, pôr os agitadores em movimento e começar a medição do consumo de oxigénio ao abrigo da luz. Verificar diariamente a temperatura, os agitadores e o registador coulombimétrico do consumo de oxigénio, e registar quaisquer modificações de cor no conteúdo dos frascos. Fazer a leitura dos consumos de oxigénio referentes aos seis frascos directamente, por um método apropriado, por exemplo a partir dos seis gráficos do registador das curvas de CBO. No final da incubação, normalmente decorridos 28 dias, medir o valor do pH do conteúdo dos frascos e determinar a concentração residual da substância química de ensaio e de qualquer produto intermediário e, no caso de substâncias solúveis na água, a concentração do COD (apêndice 2.4). Tomar precauções especiais no caso das substâncias químicas voláteis. No caso de se prever nitrificação, determinar a concentração de nitrato e de nitrito, se possível.

VII.3. RESULTADOS E RELATÓRIO

VII.3.1. **Tratamento dos resultados**

Dividir o consumo de oxigénio (mg) da substância química de ensaio, correspondente a um determinado período, pela massa da substância química de ensaio utilizada, corrigindo aquele com o valor referente ao branco de inóculo de controlo correspondente ao mesmo período. Obtém-se assim a CBO, expressa em mg de oxigénio/mg de substância química de ensaio, ou seja:

$$\text{CBO} = \frac{(\text{mg } O_2 \text{ consumido pela subst. de ensaio} - \text{mg } O_2 \text{ consumido pelo branco})}{(\text{mg de substância de ensaio no frasco})}$$

= mg de O_2/mg de substância de ensaio

▼B

Deste modo, obtém-se a percentagem de biodegradação pela expressão:

$$\%\ \text{biodegradacão} = \%\ \text{CTeO} = \frac{\text{CBO (mg } O_2\text{/mg de substância química)}}{\text{CTeO (mg } O_2\text{/mg de substância química)}} \times 100$$

Para misturas, calcular a CTeO por análise elementar, tal como para um composto único. Utilizar o valor de CTeO adequado ($CTeO_{NH4}$ ou $CTeO_{NO3}$) consoante não haja nitrificação ou esta seja completa (apêndice 2.2). Todavia, se houver nitrificação mas se esta for incompleta, efectuar uma correcção decorrente do oxigénio consumido por nitrificação, calculado a partir das variações nas concentrações de nitrito e de nitrato (apêndice 5).

Calcular a percentagem de biodegradação primária a partir das perdas da substância química específica (original) (ver ponto I.7.2).

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100\ \%$$

Se tiver havido uma perda de substância química de ensaio no frasco n.º 1, medir a variação físico-química, registar esse facto e utilizar a concentração da substância química de ensaio (Sb) decorridos 28 dias, nesse frasco, para calcular a percentagem de biodegradação.

No caso de se efectuarem determinações de COD (facultativas), calcular a percentagem de biodegradação final pela expressão:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}}\right) \times 100\ \%$$

conforme descrito no ponto I.7.1. Se tiver havido uma perda de COD no frasco n.º 1, ao medir-se a remoção por via físico-química, deve utilizar-se a concentração de GOD nesse frasco para calcular a percentagem de biodegradação.

Registar todos os resultados na folha de dados anexa.

VII.3.2. **Validade dos resultados**

O oxigénio consumido pelo branco de inóculo é, normalmente, de 20-30 mg de O_2/l e não deverá ser superior a 60 mg/l em 28 dias. Os valores superiores a 60 mg/l exigem uma análise crítica dos resultados e das técnicas experimentais. No caso de o valor do pH estar fora do intervalo 6-8,5 e se o oxigénio consumido pela substância de ensaio for inferior a 60 %, o ensaio deverá ser repetido com uma concentração inferior de substância química de ensaio.

Ver também o ponto I.5.2.

Se a percentagem de degradação da anilina, calculada a partir do consumo de oxigénio, não exceder 40 %, decorridos sete dias, e 65 %, decorridos catorze dias, o ensaio não deve ser considerado válido.

VII.3.3. **Relatório**

Ver ponto I.8.

VII.4. FOLHA DE DADOS

Como exemplo de folha de dados apresenta-se a seguinte:

ENSAIO DO MITI (I)

1. **LABORATÓRIO**

2. **DATA DO INÍCIO DO ENSAIO**

▼B

3. **SUBSTÂNCIA DE ENSAIO**

Nome:

Concentração da solução de reserva: mg/l da substância

Concentração inicial no meio, C_o: mg/l da substância

Volume da mistura reaccional: ml

CTeO: mg O_2/l

4. **INÓCULO**

Locais de colheita das amostras de lama:

1. ...
2. ...
3. ...
4. ...
5. ...
6. ...
7. ...
8. ...
9. ...
10. ...

Concentração de sólidos em suspensão nas lamas activadas depois de aclimatização com águas residuais sintéticas = mg/l,

Volume de lamas activadas por litro de meio final = ml,

Concentração de lamas no meio final = mg/l.

5. **CONSUMO DE OXIGÉNIO: BIODEGRADABILIDADE**

Tipo de respirómetro utilizado:

			Tempo (dias)				
			0	7	14	21	28
O_2 consumido (mg) pela substância de ensaio	a_1						
	a_2						
	a_3						
O_2 consumido (mg) pelo branco	b						
O_2 consumido (mg) corrigido	$(a_1 - b)$ $(a_2 - b)$ $(a_3 - b)$						
CBO por mg de substância química de ensaio	$\frac{(a - b)}{C_o V}$	Frasco 1					
		Frasco 2					
		Frasco 3					
% de degradação $\frac{CBO}{CTeO} \times 100$		1					
		2					
		3					
		média (1)					

(1) Não retomar o valor médio, se existirem diferenças consideráveis entre os duplicados.

▼B

NB: Podem ser utilizados esquemas idênticos para a substância química de referência.

6. **ANÁLISE DE CARBONO** (opcional)

Analisador de carbono:

Frasco	COD				% de COD removido	Média
	Medido		Corrigido			
Água + substância de ensaio	a				—	—
Lamas + substância de ensaio	b_1		b_1 - c			
Lamas + substância de ensaio	b_2		b_2 - c			
Lamas + substância de ensaio	b_3		b_3 - c			
Branco de controlo	c		—		—	—

% de COD removido $\frac{a_1 - (b - c)}{a} \times 100$

7. **DADOS ANALÍTICOS ESPECÍFICOS DA SUBSTÂNCIA QUÍMICA**

	Quantidade residual de substância de ensaio no final do teste	% de degradação
ensaio em branco com água	S_b	
meio inoculado	S_{a1}	
	S_{a2}	
	S_{a3}	

% de degradação $= \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

Calcular a percentagem de degradação para os frascos a_1, a_2 e a_3, respectivamente.

8. **OBSERVAÇÕES**

Deve anexar-se a curva de CBO em função do tempo, se existir.

▼B

Apêndice 1

ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

OD: O oxigénio dissolvido (mg/l) é a concentração do oxigénio dissolvido numa amostra aquosa.

CBO: A carência bioquímica de oxigénio (g) é a quantidade de oxigénio consumida pelos microorganismos ao metabolizarem um composto de ensaio; também se exprime em g de oxigénio consumido por g de composto de ensaio (ver método C.5).

CQO: A carência química de oxigénio (g) é a quantidade de oxigénio consumida durante a oxidação de um composto de ensaio com dicromato ácido a quente; permite medir a quantidade de matérias oxidáveis presentes; também se exprime em g de oxigénio consumido por g de composto de ensaio (ver método C.6).

COD: O carbono orgânico dissolvido é o carbono orgânico presente na solução ou que passa através de um filtro de 0,45 microns ou que permanece no sobrenadante após centrifugação a 40 000 $m.s^{-2}$ (± 4 000 g) durante 15 minutos.

CTeO: A carência teórica de oxigénio (mg) é a quantidade de oxigénio necessária para oxidar completamente uma substância química; calcula-se a partir da fórmula molecular (ver apêndice 2.2) e também se exprime em mg de oxigénio necessário por mg de composto de ensaio.

CO_2Te: O dióxido de carbono teórico (mg) é a quantidade calculada do dióxido de carbono que seria produzido a partir do teor de carbono medido ou conhecido do composto de ensaio, quando totalmente mineralizado; também se exprime em mg de dióxido de carbono libertado por mg de composto de ensaio.

COT: O carbono orgânico total de uma substância é a soma do carbono orgânico em solução e em suspensão.

CI: Carbono inorgânico.

CT: Carbono total, é a soma do carbono orgânico e inorgânico presente na amostra.

Biodegradação primária:

é a alteração da estrutura química de uma substância efectuada por acção biológica, tendo como resultado a perda de propriedades específicas dessa substância.

Biodegradação total (aeróbia):

é o nível de degradação alcançado quando o composto de ensaio é totalmente utilizado pelos microorganismos, produzindo dióxido de carbono, água, sais minerais e novos constituintes celulares microbianos (biomassa).

Facilmente biodegradável:

é uma classificação arbitrária para as substâncias químicas que passaram nos diversos ensaios específicos de despiste da biodegradabilidade total; dado que esses ensaios são tão exigentes, assumiu-se que essas substâncias serão biodegradadas fácil e completamente em ambiente aquático, sob condições aeróbias.

▼B

Intrinsecamente biodegradável:

é uma classificação de substâncias químicas relativamente às quais existem provas inequívocas de biodegradação (primária e total) num qualquer ensaio reconhecido de biodegradabilidade.

Tratáveis:

é a possibilidade de certos compostos serem removidos durante o tratamento biológico de águas residuais sem afectarem desfavoravelmente o funcionamento normal do processo de tratamento. De um modo geral, os compostos facilmente biodegradáveis são tratáveis mas o mesmo não sucede com todos os compostos intrinsecamente biodegradáveis. Também podem ser utilizados processos abióticos.

Tempo de latência:

é o tempo decorrido desde a inoculação, num ensaio de redução gradual, até que a percentagem de degradação tenha aumentado pelo menos até 10 %. O tempo de latência é normalmente bastante variável e pouco reprodutível.

Tempo de degradação:

é o tempo decorrido desde o final do tempo de latência até ao momento em que se atinge 90 % do nível máximo de degradação.

Período dos dez dias:

é o período de dez dias que se segue imediatamente a um nível de degradação de 10 %.

▼B

Apêndice 2

CÁLCULO E DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS CARACTERÍSTICOS ADEQUADOS

Consoante o método escolhido, assim serão necessários determinados parâmetros característicos. Na secção seguinte descreve-se o modo de obter esses valores. A utilização desses parâmetros foi descrita em cada um dos métodos.

1. **Teor de carbono**

Calcula-se o teor de carbono a partir da composição elementar conhecida ou determina-se por análise elementar da substância de ensaio.

2. **Carência teórica de oxigénio (CTeO)**

A carência teórica de oxigénio (CTeO) pode ser calculada se for conhecida a composição elementar ou pode ser determinada por análise elementar. Para o seguinte composto genérico

$C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$ sera:

sem nitrificação,

$$ThOD_{NH4} = \frac{16\ [2\ c + 1/2(h - cl - 3\ n) + 3\ s + 5/2\ p + 1/2\ na - o]}{\text{Massa molecular}}\ \text{mg/mg}$$

ou, com nitrificação,

$$ThOD_{NO3} = \frac{16\ [2\ c + 1/2(h - cl) + 5/2\ n + 3\ s + 5/2\ p + 1/2\ na - o]}{\text{Massa molecular}}\ \text{mg/mg}$$

3. **Carência química de oxigénio (CQO)**

A carência química de oxigénio (CQO) determina-se em conformidade com o método C.6.

4. **Carbono orgânico dissolvido (COD)**

Por definição, o carbono orgânico dissolvido (COD) é o carbono orgânico de qualquer substância química ou de qualquer mistura em água que não é relido por um filtro de 0,45 microns.

Retiram-se amostras dos recipientes de ensaio e filtram-se imediatamente no equipamento de filtração, utilizando um filtro de membrana adequado. Os primeiros 20 ml (esta quantidade pode ser reduzida quando se utilizam filtros pequenos) de filtrado são rejeitados. Retêm-se volumes de 10-20 ml ou inferiores, se forem injectados (volume dependente da quantidade necessária para o analisador de carbono), para análise de carbono. Determina-se a concentração de COD por meio de um analisador de carbono orgânico capaz de medir com exactidão uma concentração de carbono equivalente ou inferior a 10 % da concentração do COD inicial utilizada no ensaio.

As amostras filtradas que não possam ser analisadas no próprio dia do trabalho podem ser conservadas num frigorífico à temperatura de 2-4°C, durante 48 horas, ou a temperaturas inferiores a - 18°C durante períodos mais longos.

Observações:

Os filtros de membrana são frequentemente impregnados com agentes tensioactivos para hidrofilização. Deste modo, o filtro pode conter até alguns mg de carbono orgânico solúvel que pode interferir com as determinações de biodegradabilidade. Os agentes tensioactivos e outros compostos orgânicos solúveis são removidos dos filtros por fervura em água desionisada durante três períodos de uma hora. Depois, os filtros podem ser mantidos em água durante uma semana. No caso de se utilizarem embalagens de filtros descartáveis, cada lote deve ser verificado para se confirmar que não liberta carbono orgânico solúvel.

▼B

A substância química de ensaio pode ser retida por adsorção, dependendo do tipo de filtro de membrana. Por esse motivo, é aconselhável garantir que a substância química de ensaio não é retida pelo filtro.

Em vez da filtração, pode recorrer-se a centrifugação a 40 000 $m.s^{-2}$ (4 000 g), durante 15 minutos, para diferenciar o COD do COT. Este método não é fiável para uma concentração inicial < 10 mg de COD/l uma vez que nem todas as bactérias são removidas, nem o carbono que faz parte do plasma bacteriano é redissolvido.

BIBLIOGRAFIA

— Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 12th ed, Am. Pub. Hlth. Ass., Am. Wat. Oll. control Fed., Oxygen Demand, 1965, p. 65.

— Wagner, R. Von Wasser, 1976, Vol. 46, 139.

— DIN-Entwurf 38409 Teil 41 — Deutsche Einhcitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung, Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H). Bestimmung des Chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB) (H 41), Normenausschuß Wasserwesen (NAW) in DIN Deutsches Institut für Normung e.v.

— Gerike, P. The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, Vol. 13 (1), 169.

▼B

Apêndice 3

AVALIAÇÃO DA BIODEGRADABILIDADE DE SUBSTÂNCIAS POUCO SOLÚVEIS

Nos ensaios de biodegradabilidade com substâncias pouco solúveis é necessário prestar especial atenção aos aspectos que se seguem.

Embora os líquidos homogéneos raramente apresentem problemas de amostragem, recomenda-se que se faça a homogeneização das substâncias sólidas por meios adequados, para evitar erros devidos a heterogeneidade. É necessário tomar cuidados especiais quando se pretendem amostras representativas de alguns miligramas, obtidas a partir de misturas de substâncias químicas ou de outras substâncias com grandes quantidades de impurezas.

Podem utilizar-se diversas formas de agitação durante os ensaios. É necessário ter a precaução de utilizar apenas a agitação suficiente para manter as substâncias químicas dispersas e para evitar sobreaquecimento, excessiva formação de espuma e forças de corte excessivas.

Pode ser utilizado um emulsionante que produza uma dispersão estável da substância química. Não deve ser tóxico para as bactérias e não deve ser biodegradado ou provocar espuma nas condições de ensaio.

Aos solventes, aplica-se o mesmo critério dos emulsionantes.

Não se recomenda a utilização de veículos sólidos para as substâncias de ensaio no estado sólido embora possam ser adequados para as substâncias oleosas.

No caso de se utilizarem substâncias auxiliares, tais como os emulsionantes, solventes e veículos, deve efectuar-se também uma experiência com um branco que contenha a substância auxiliar.

Pode ser utilizado qualquer um dos três ensaios respirométricos de CO_2, CBO e MITI, para estudar a biodegradabilidade de compostos pouco solúveis.

BIBLIOGRAFIA

— de Morsier, A. et al. Biodegradation tests for poorly soluble compounds. Chemosphere, 1987, Vol. 16, 833.

— Gerike, P. The Biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, Vol. 13, 169.

▼B

Apêndice 4

AVALIAÇÃO DA BIODEGRADABILIDADE DE SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS QUE POSSAM SER TÓXICAS PARA O INÓCULO

Quando se submete uma substância química a um ensaio de biodegradabilidade fácil e esta não é, aparentemente, biodegradável, recomenda-se o procedimento seguinte, no caso de se pretender estabelecer uma distinção entre inibição e inércia (Reynolds et al., 1987).

Para os ensaios de toxicidade e de biodegradação devem ser utilizados inóculos semelhantes ou idênticos.

Para se avaliar a toxicidade de substâncias químicas de ensaio através de ensaios de biodegradabilidade fácil, sugere-se a aplicação de um ou de uma combinação do método de inibição da taxa respiratória das lamas (ensaio de inibição da respiração em lamas activadas — Dir 88/302/CEE), do CBO e/ou da inibição do crescimento.

No caso de se pretender evitar a inibição decorrente da toxicidade, sugere-se que as concentrações da substância de ensaio utilizadas no ensaio de biodegradabilidade fácil sejam inferiores a 1/10 dos valores CE_{50} (ou inferiores aos valores de CE_{20}), obtidos em ensaios de toxicidade. Não é provável que os compostos com um valor de CE_{50} superior a 300 mg/l possuam efeitos tóxicos em ensaios de biodegradabilidade imediata.

É provável que valores de CE_{50} inferiores a 20 mg/l causem grandes problemas na continuação dos testes. Devem ser utilizadas baixas concentrações de ensaio, sendo necessário recorrer ao ensaio rigoroso e sensível do frasco fechado ou utilizar material marcado com ^{14}C. Em alternativa, um inóculo aclimatizado pode permitir a utilização de concentrações mais elevadas da substância de ensaio. Contudo, neste último caso, perde-se o critério específico do ensaio de biodegradabilidade imediata.

BIBLIOGRAFIA

Reynolds, L. et al. Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere, 1987, Vol. 16, 2259.

▼B

Apêndice 5

CORRECÇÃO DO CONSUMO DE OXIGÉNIO DECORRENTE DA INTERFERÊNCIA POR NITRIFICAÇÃO

Os erros provocados por não se considerar a nitrificação na avaliação da biodegradabilidade das substâncias de ensaio que não contêm azoto através do consumo de oxigénio são marginais (não superiores a 5 %), mesmo no caso de a oxidação do azoto do amónio do meio ocorrer irregularmente, tal como sucede em relação aos recipientes de ensaio e ao branco. Contudo, para as substâncias de ensaio que contêm azoto, podem surgir erros graves.

Se houver nitrificação mas esta não for completa, o consumo de oxigénio pela mistura reaccional pode ser corrigido em função da quantidade de oxigénio utilizada para oxidar amónio em nitrito e nitrato, se as variações de concentração do nitrito e do nitrato durante a incubação forem determinadas tendo em conta as equações seguintes:

$$2\ NH_4Cl + 3\ O_2 = 2\ HNO_2 + 2\ HC1 + 2\ H_2O \quad (1)$$

$$2\ HNO_2 + O_2 = 2\ HNO_3 \quad (2)$$

Globalmente é:

$$2\ NH_4C1 + 4\ O_2 = 2\ HNO_3 + 2\ HC1 + 2\ H_2O \quad (3)$$

A partir da equação (1) verifica-se que o consumo de oxigénio por cada 28 g de azoto contido no cloreto de amónio (NH_4C1) oxidado a nitrito é 96 g, isto é, um factor de 3,43 (96/28). De modo idêntico, a partir da equação (3), verifica-se que o consumo de oxigénio por cada 28 g de azoto oxidado a nitrato é 128 g, isto é, traduz-se por um factor de 4,57 (128/28).

Uma vez que as reacções são sequenciais, sendo provocadas por espécies características e diferentes de bactérias, é possível que a concentração de nitrito aumente ou diminua; neste último caso, formar-se-ia uma concentração equivalente de nitrato. Deste modo, o oxigénio consumido na formação de nitrato é o acréscimo da concentração de nitrato multiplicado por 4,57, ao passo que o oxigénio associado à formação de nitrito é o acréscimo da concentração de nitrito multiplicado por 3,43 ou, se houver diminuição da sua concentração, a perda de oxigénio é o decréscimo de concentração multiplicado por - 3,43.

Dito de outro modo:

O_2 consumido na formação de nitrato = 4,57 × acréscimo na concentração de nitrato-N (4)

e

O_2 consumido na formação de nitrito = 3,43 × acréscimo na concentração de nitrito-N (5)

e

perda de O_2 por reacção com nitrito = ± 3,43 × acréscimo na concentração de nitrito-N (6)

pelo que consumo de

O_2 devido à nitrificação = - 3,43 × variação da concentração de nitrito-N + 4,57 × acréscimo na concentração de nitrato-N (7)

e, portanto, consumo de

O_2 devido a oxidação de C = consumo total observado — consumo devido à nitrificação (8)

Em alternativa, se apenas se determinar o azoto oxidado total, o consumo de oxigénio devido à nitrificação pode considerar-se igual, em primeira aproximação, a 4,57 × acréscimo do azoto oxidado.

O valor corrigido em função do consumo de oxigénio provocado pela oxidação do carbono é então comparado com o valor $CTeO_{NH4}$, conforme foi calculado no apêndice 2.

▼B

C.5. DEGRADAÇÃO — CARÊNCIA BIOQUÍMICA DE OXIGÉNIO

1. MÉTODO

1.1. INTRODUÇÃO

O objectivo deste método consiste em medir a carência bioquímica de oxigénio (CBO) de substâncias orgânicas sólidas ou líquidas.

Os dados elaborados com este ensaio relacionam-se com os compostos solúveis em água; todavia, em princípio pelo menos, é possível ensaiar também compostos voláteis e compostos de fraca solubilidade em água.

O método aplica-se apenas aos materiais de ensaio orgânicos que não sejam inibidores das bactérias nas concentrações utilizadas no ensaio. No caso de o material de ensaio não ser solúvel para valores da concentração de ensaio, será necessário recorrer a acções especiais tais como a dispersão ultra-sónica para se conseguir uma boa dispersão do material de ensaio.

A informação sobre a toxicidade do composto químico pode ser útil para a interpretação de resultados insuficientes e para a selecção das concentrações de ensaio apropriadas.

1.2. DEFINIÇÃO E UNIDADES

Define-se a CBO como sendo a massa de oxigénio dissolvido necessária para o processo de oxidação bioquímica de um volume específico de solução da substância sob as condições prescritas.

Os resultados exprimem-se em gramas de CBO por grama de substância ensaiada.

1.3. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

É desejável a utilização de uma substância de referência adequada para verificação da actividade do inóculo.

1.4. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

Inocula-se com microorganismos uma quantidade predeterminada da substância dissolvida ou dispersa num meio adequado e bem arejado e depois faz-se a incubação ao abrigo de luz e a uma temperatura ambiente previamente definida e constante.

Determina-se a CBO pela diferença entre o teor em oxigénio dissolvido no início e no termo do ensaio. A duração do ensaio deve ser de pelo menos 5 dias e não deve exceder 28 dias.

Numa experiência paralela deve efectuar-se um ensaio em branco sem conter qualquer substância de ensaio.

1.5. CRITÉRIOS DE QUALIDADE

A determinação da CBO não pode ser considerada uma determinação válida da biodegradabilidade de uma substância. Este ensaio apenas pode ser considerado como um ensaio de pesquisa preliminar.

1.6. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

Prepara-se uma solução ou dispersão preliminar da substância para se obter uma concentração da CBO compatível com o método utilizado. Determina-se depois a CBO utilizando qualquer método adequado nacional ou internacionalmente normalizado.

▼B

2. **RESULTADOS E AVALIAÇÃO**

Calcula-se a CBO existente na solução preliminar de acordo com o método normalizado seleccionado e converte-se em gramas de CBO por grama de substância ensaiada.

3. **RELATÓRIO**

O método utilizado deverá ser especificado.

O valor da carência bioquímica de oxigénio deverá ser uma média de pelo menos três medições válidas.

Todas as informações e observações relevantes para a interpretação dos resultados devem ser descritas, especialmente no que diz respeito a impurezas, estado físico, efeitos tóxicos e composição inerente da substância, que possa afectar os resultados.

Deve anotar-se a utilização de um aditivo para inibir a nitrificação biológica.

4. REFERÊNCIAS

Enumeração de métodos normalizados, por exemplo:

NF T 90-103: Determination of the biochemical oxygen demand.

NBN 407: Biochemical oxygen demand.

NEN 3235 5.4: Bepaling van het biochemish zuurstofverbruik (BZV).

The determination of biochemical oxygen demand, Methods for the examination of water and associated materials, HMSO, London.

ISO 5815: Determination of biochemical oxygen demand after n days.

▼B

C.6. DEGRADAÇÃO — CARÊNCIA QUÍMICA DE OXIGÉNIO

1. MÉTODO

1.1. INTRODUÇÃO

O objectivo deste método consiste em medir a carência química de oxigénio (CQO) de substâncias orgânicas sólidas ou líquidas por um processo arbitrário normalizado, sob condições laboratoriais previamente estabelecidas.

A informação sobre a fórmula da substância será útil para efectuar este ensaio e para interpretar os resultados obtidos (por exemplo, sais de halogéneos, sais ferrosos de compostos orgânicos, compostos organoclorados).

1.2. DEFINIÇÕES E UNIDADES

A carência química de oxigénio é uma medida da oxidabilidade de uma substância, e exprime-se pela quantidade equivalente de oxigénio de um reagente oxidante, consumido pela substância, sob condições laboratoriais previamente determinadas.

Exprime-se o resultado em gramas de CQO por grama da substância ensaiada.

1.3. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

Não é necessário utilizar substâncias de referência em todos os casos quando se investiga uma substância nova. Elas deverão servir essencialmente para calibrar o método de vez em quando e para permitir a comparação dos resultados quando se aplicar outro método.

1.4. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

Utilizando dicromato de potássio em ácido sulfúrico concentrado e utilizando sulfato de prata como catalisador, oxida-se uma quantidade predeterminada da substância, dissolvida ou dispersa em água, e levada a refluxo, durante duas horas. Determina-se o dicromato residual por um processo de titulação com um padrão de sulfato de amónio ferroso.

No caso das substâncias que contêm cloro, adiciona-se sulfato mercúrico ([1]) para reduzir a interferência.

1.5. CRITÉRIOS DE QUALIDADE

Devido ao processo arbitrário de determinação, o valor da CQO constitui um «indicador de oxidabilidade» e como tal utiliza-se como um método prático para a medição de matéria orgânica.

Os cloretos podem interferir com este ensaio; a redução inorgânica ou os agentes oxidantes podem interferir também com a determinação da CQO.

Alguns compostos cíclicos e muitas substâncias voláteis (por exemplo, os ácidos gordos de baixo peso molecular) não são oxidados totalmente neste ensaio.

1.6. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

Prepara-se uma solução ou dispersão preliminar da substância de ensaio para se obter uma CQO entre 250 e 600 mg por litro.

([1]) Após a utilização, as soluções que contêm sais de mercúrio deverão ser tratadas para evitar a contaminação do ambiente com mercúrio.

▼B

Anotações:

No caso das substâncias fracamente solúveis ou não dispersíveis, pode pesar-se uma quantidade da substância finamente pulverizada ou da substância líquida, correspondente a cerca de 5 mg da CQO, e depois coloca-se no aparelho experimental com água.

A carência química de oxigénio (CQO) é determinada frequente e especialmente no caso das substâncias fracamente solúveis, recorrendo às vantagens de uma variante do método, isto é, num sistema fechado com um igualizador de pressão (H. Kelkenberg, 1975). De acordo com esta modificação, é possível quantificar frequentemente com sucesso os compostos para os quais as determinações são muito difíceis pelo método convencional (por exemplo, o ácido acético). Contudo, o método fracassa também no caso da piridina. Se a concentração do dicromato de potássio, conforme prescrito na referência (1), aumentar para 0,25 N (0,0416 M), fica facilitada a pesagem directa de 5-10 mg de substância o que é essencial para a determinação da CQO de substâncias fracamente solúveis em água (referência 2).

Caso contrário, determina-se depois a CQO utilizando qualquer método adequado nacional ou internacionalmente normalizado.

2. **RESULTADOS E AVALIAÇÃO**

Calcula-se a CQO existente no balão de ensaio experimental utilizando o método normalizado seleccionado e depois converte-se em gramas de CQO por grama de substância ensaiada.

3. **RELATÓRIO**

Deverá especificar-se o método de referência utilizado.

A carência química de oxigénio deverá ser a média de pelo menos três medições. Toda a informação e anotações relevantes para a interpretação dos resultados deverão ser descritas, especialmente no que diz respeito a impurezas, estado físico e propriedades inerentes à substância (se forem conhecidas) que possam afectar os resultados.

Deve ser mencionada a utilização de sulfato mercúrico para minimizar a interferência dos cloretos.

4. **REFERÊNCIAS**

(1) Kelkenberg, H. (1975). Z. von Wasser und Abwasserforscnung, 8, 146.

(2) Gerike, P. (1984). The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 13, 169.

Enumeração de métodos normalizados, por exemplo:

NBN T 91-201 Determination of the chemical oxygen demand.

ISBN 0 11 7512494 Chemical oxygen demand (dichromate value) of polluted and waste waters.

NF T 90-101 Determination of the chemical oxygen demand.

DS 217 = water analysis Determination of the chemical oxygen demand.

DIN 38409-H-41 Determination of the chemical oxygen demand (COD) within the range above 15 mg per litre.

NEN 3235 5.3 Bepaling van het chemisch zuurstofverbruik.

ISO 6060 Water quality: chemical oxygen demand dichromate methods.

▼B

C.7. DEGRADAÇÃO — DEGRADAÇÃO ABIÓTICA: HIDRÓLISE EM FUNÇÃO DO PH

1. MÉTODO

O presente método de ensaio é equivalente ao método OECD TG 111 (2004).

1.1. INTRODUÇÃO

As substâncias químicas podem afluir às águas de superfície por vias tais como a aplicação directa, a dispersão de pulverizados, a escorrência, a drenagem, a eliminação de resíduos, os efluentes industriais, domésticos e agrícolas e a deposição atmosférica, podendo ser transformados nas referidas águas por processos químicos (por exemplo hidrólise ou oxidação), fotoquímicos e/ou microbianos. A presente directriz descreve um método de ensaio laboratorial com o objectivo de avaliar as transformações por hidrólise abiótica de substâncias químicas em sistemas aquáticos com valores de pH correntes (pH 4 - 9) e baseia-se nas directrizes em vigor (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7).

O objectivo dos ensaios consiste em determinar (i) a velocidade de hidrólise da substância em estudo em função do pH e (ii) a identidade ou natureza, bem como as velocidades de formação e transformação, dos produtos de hidrólise a que os organismos possam ser expostos. Os estudos em causa podem ser necessários no caso de substâncias químicas directamente aplicadas na água ou que possam afectar o ambiente pelas outras vias atrás referidas.

1.2. DEFINIÇÕES E UNIDADES

Ver o apêndice 2.

1.3. APLICABILIDADE DO MÉTODO

O método é aplicável, de forma geral, a substâncias químicas (marcadas ou não) para as quais exista um método analítico de precisão e sensibilidade suficientes. É aplicável a compostos ligeiramente voláteis e não voláteis de solubilidade suficiente em água, não devendo ser aplicado a substâncias altamente voláteis em meio aquoso (nomeadamente fumigantes e solventes orgânicos), dado que as mesmas não podem ser mantidas em solução nas condições experimentais do ensaio. A realização do ensaio com substâncias de solubilidade mínima em água poderá revelar-se difícil (8).

1.4. PRINCÍPIO DO MÉTODO

Procede-se à adição da substância em estudo a soluções-tampão aquosas estéreis de diversos valores de pH (pH 4, 7 e 9), seguida de incubação ao abrigo da luz em condições laboratoriais controladas (a temperaturas constantes). Após intervalos de tempo adequados, analisam-se as soluções-tampão para a pesquisa da substância em estudo, bem como de produtos de hidrólise. O recurso a substâncias de ensaio marcadas (por exemplo com ^{14}C) permite obter um balanço de massas com maior facilidade.

O método de ensaio é concebido numa forma progressiva que se ilustra e elucida no apêndice 1. Cada nível é condicionado pelos resultados do nível anterior.

▼B

1.5. INFORMAÇÕES SOBRE A SUBSTÂNCIA EM ESTUDO

As substâncias em estudo a utilizar para a determinação da velocidade de hidrólise podem ser marcadas ou não. As substâncias marcadas são especialmente úteis para o estudo do mecanismo da hidrólise e para o estabelecimento do balanço de massas; todavia, em alguns casos especiais, a marcação poderá não ser totalmente indispensável. Recomenda-se a marcação com ^{14}C, embora o recurso a outros isótopos, nomeadamente ^{13}C, ^{15}N e ^{3}H, possa revelar-se também útil. Na medida do possível, a marcação deve ser posicionada na parte ou nas partes mais estáveis da molécula. Por exemplo, se a substância em causa contiver um anel, é necessária a marcação do mesmo; se a substância contiver dois ou mais anéis, poderá ser necessário efectuar ensaios separados para avaliar o comportamento de cada anel marcado e obter informações adequadas sobre a formação dos produtos de hidrólise. A substância em estudo deve ter uma pureza mínima de 95 %.

Antes da realização de um ensaio de hidrólise, devem conhecer-se os seguintes dados sobre a substância em estudo:

a) Solubilidade em água [método de ensaio A.6];

b) Solubilidade em solventes orgânicos;

c) Pressão de vapor [método de ensaio A.4] e/ou constante de Henry;

d) Coeficiente de partição n-octanol/água [método de ensaio A.8];

e) Constante de dissociação (pK_a) [Directriz OECD 112] (9);

f) Velocidade de fototransformação directa e indirecta em água, se adequado.

Devem existir métodos analíticos para a quantificação da substância em estudo e, caso seja relevante, para a identificação e quantificação dos produtos de hidrólise em solução aquosa (ver também a secção 1.7.2).

1.6. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

Sempre que possível, deverão utilizar-se substâncias de referência para a identificação e quantificação dos produtos de hidrólise por métodos espectroscópicos e cromatográficos ou outros métodos de sensibilidade adequada.

1.7. CRITÉRIOS DE QUALIDADE

1.7.1. **Recuperação**

A análise, pelo menos em duplicado, das soluções-tampão ou extractos das mesmas imediatamente após a adição da substância em estudo fornece uma primeira indicação da repetibilidade do método analítico e da uniformidade do procedimento de adição da substância. Nas fases posteriores dos ensaios, as recuperações decorrem dos balanços de massas (em caso de utilização de substâncias marcadas). As recuperações deverão situar-se entre 90 % e 110 %, para substâncias marcadas ou não (7). Caso seja tecnicamente difícil atingir este intervalo, é aceitável uma recuperação de 70 % no caso de substâncias não marcadas, devendo, contudo, apresentar-se uma justificação.

▼B

1.7.2. **Repetibilidade e sensibilidade do método analítico**

A repetibilidade do(s) método(s) analítico(s) utilizado(s) para a quantificação da substância em estudo e, posteriormente, dos produtos de hidrólise pode ser comprovada pela análise em duplicado das mesmas soluções-tampão (ou de extractos das mesmas) após a formação de uma quantidade suficiente de produtos de hidrólise para quantificação.

O método analítico deve ser suficientemente sensível para quantificar a substância em estudo em concentrações da ordem de 10 % ou menos da concentração inicial. Se pertinente, os métodos analíticos deverão também ser suficientemente sensíveis para quantificar quaisquer produtos de hidrólise que constituam 10 % ou mais da quantidade adicionada (em qualquer fase do ensaio) até 25 % ou menos da concentração máxima.

1.7.3. **Intervalos de confiança para os dados de cinética da hidrólise**

Os intervalos de confiança devem ser objecto de tratamento informático de forma a obter os coeficientes de regressão, as constantes de velocidade, os tempos de semitransformação e quaisquer outros parâmetros cinéticos (por exemplo, DT50).

1.8. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.8.1. **Equipamento e aparelhagem**

O ensaio deve ser realizado em recipientes de vidro (tubos de ensaio ou recipientes pequenos) ao abrigo da luz e em condições estéreis, se necessário, excepto se existirem dados (por exemplo, coeficiente de partição n-octanol-água) que indiquem a possibilidade de a substância em estudo aderir ao vidro. Nesse caso, deverá estudar-se a possibilidade de utilizar materiais alternativos (nomeadamente Teflon). A adesão da substância ao vidro poderá também ser minimizada por recurso a um ou mais dos seguintes métodos:

— determinação da massa de substância em estudo e dos produtos de hidrólise aderentes ao recipiente de ensaio,

— uso de um banho de ultra-sons,

— lavagem com solvente do material de vidro com após a análise de cada amostra,

— uso de produtos na forma de formulações,

— aumento da quantidade de co-solvente utilizada para a adição da substância em estudo ao sistema; em caso de utilização de um co-solvente, este não deverá hidrolisar a substância em estudo.

Em geral, é necessário utilizar agitadores mecânicos de banhos-maria com controlo de temperatura ou incubadores com controlo termostático para a incubação das soluções em estudo.

O equipamento de laboratório de uso corrente deverá incluir, nomeadamente, o seguinte:

— medidor de pH,

▼B

— instrumentos de análise tais como aparelhos de GC, HPLC, TLC, incluindo sistemas adequados de detecção para a análise de substâncias marcadas ou não com radioisótopos ou pelo método de diluição isotópica inversa,

— instrumentos de identificação (MS, GC-MS, HPLC-MS, RMN, etc.),

— contador de cintilação líquida,

— ampolas de decantação para extracção líquido-líquido,

— instrumentos para a concentração das soluções e extractos (por exemplo, evaporador rotativo),

— dispositivo de controlo da temperatura (por exemplo, banho-maria).

Os reagentes incluem, nomeadamente:

— solventes orgânicos de qualidade analítica (hexano, diclorometano, etc.),

— líquido de cintilação,

— soluções-tampão (ver secção 1.8.3).

O material de vidro, a água de qualidade analítica e as soluções-tampão a utilizar nos ensaios de hidrólise devem ser esterilizados.

1.8.2. **Adição da substância em estudo**

A substância em estudo, na forma de solução aquosa, é adicionada às diversas soluções-tampão (ver apêndice 3). Caso tal seja necessário a uma dissolução adequada, é permitida a utilização de pequenas quantidades de solventes miscíveis com água (tais como acetonitrilo, acetona e etanol) para a adição e difusão da substância em estudo, que não devem contudo exceder, em geral, 1 % (v/v). O recurso a uma concentração mais elevada de solvente (por exemplo, no caso de a substância em estudo ter uma solubilidade reduzida) apenas é permitida se for provado que o solvente não tem efeitos na hidrólise da substância em estudo.

Não se recomenda o uso rotineiro de produtos na forma de formulações, dado que não é de excluir a possibilidade de os ingredientes da formulação interferirem no processo de hidrólise. A utilização dos produtos em causa poderá contudo ser uma alternativa adequada no caso de substâncias em estudo de solubilidade reduzida em água ou que adiram ao vidro (ver a secção 1.8.1).

Deve usar-se uma concentração única da substância em estudo, que não deverá exceder 0,01 M ou metade da concentração de saturação (ver o apêndice 1).

▼B

1.8.3. **Soluções-tampão**

O ensaio de hidrólise deverá ser realizado a pH 4, 7 e 9. Para tal, devem preparar-se soluções-tampão por recurso a produtos com pureza de reagente e água. O apêndice 3 apresenta alguns sistemas-tampão úteis. De referir que o sistema-tampão utilizado poderá influenciar a velocidade de hidrólise, caso em que deverá utilizar-se um sistema-tampão alternativo ([1]).

O pH de cada solução-tampão deverá ser comprovado com o auxílio de um medidor de pH com uma precisão mínima de 0,1, à temperatura requerida.

1.8.4. **Condições de ensaio**

1.8.4.1. *Temperatura*

Os ensaios de hidrólise devem ser realizados a temperaturas constantes. Para fins de extrapolação, é importante manter a temperatura com uma aproximação mínima de ± 0,5°C.

Caso o comportamento hidrolítico da substância em estudo seja desconhecido, deverá proceder-se a um ensaio preliminar (nível 1) à temperatura de 50 °C. Devem realizar-se ensaios cinéticos de nível superior a, pelo menos, três temperaturas (incluindo o ensaio a 50 °C), excepto se o ensaio de nível 1 tiver demonstrado a estabilidade hidrolítica da substância em estudo. Sugere-se uma gama de temperaturas compreendida entre 10 e 70 °C (em princípio, deverá realizar-se pelo menos um ensaio a uma temperatura inferior a 25 °C), que abrange a temperatura de referência de 25 °C e a maioria das temperaturas registadas em campo.

1.8.4.2. *Luz e oxigénio*

Nos ensaios de hidrólise deverão utilizar-se quaisquer métodos adequados para evitar os efeitos fotolíticos. Deve recorrer-se a todas as medidas adequadas para evitar a oxigenação (por exemplo, fazendo borbulhar hélio, azoto ou árgon durante 5 minutos antes de preparar a solução).

1.8.4.3. *Duração do ensaio*

O ensaio preliminar deverá ser realizado em 5 dias; os ensaios de nível superior deverão ser realizados até se verificar a hidrólise de 90 % da substância em estudo ou em 30 dias, consoante o que ocorrer primeiro.

1.8.5. **Realização do ensaio**

1.8.5.1. *Ensaio preliminar (Nível 1)*

O ensaio preliminar é realizado a 50 ± 0,5°C e pH 4,0, 7,0 e 9,0. Se, após 5 dias, a extensão da hidrólise não exceder 10 % ($t_{0,525°C}$ > 1 ano), a substância em estudo é considerada hidroliticamente estável, não sendo necessário proceder a ensaios complementares. Se for conhecida a instabilidade da substância a temperaturas relevantes no plano ambiental ([2]), não é necessário realizar o ensaio preliminar. O método analítico deverá ser suficientemente preciso e sensível para detectar uma redução de 10 % da concentração inicial.

([1]) Mabey e Mill recomendam o uso de tampões de borato ou acetato em vez de fosfato (11).

([2]) A informação em causa pode provir de outras fontes, nomeadamente dados sobre a hidrólise de compostos estruturalmente afins obtidos na literatura ou dados de outros ensaios preliminares de hidrólise à escala semiquantitativa com a substância em estudo num estádio de desenvolvimento mais elementar.

▼B

1.8.5.2. *Hidrólise de substâncias instáveis (Nível 2)*

O ensaio de nível superior (ensaio avançado) deverá realizar-se a valores de pH aos quais a substância em estudo se revelou instável no ensaio preliminar. As soluções tamponadas da substância em estudo devem ser termostatadas às temperaturas escolhidas. No caso da pesquisa de reacções de primeira ordem, cada solução deverá ser analisada a intervalos de tempo que permitam obter, no mínimo, seis valores (pontos) compreendidos, em princípio, entre 10 % e 90 % da hidrólise da substância em estudo. Remover as amostras individuais múltiplas (deve proceder-se, no mínimo, à análise de duplicados em recipientes de reacção separados) e analisar o conteúdo correspondente a cada um dos seis tempos de reacção (desta forma, obtêm-se, no mínimo, doze pontos). Considera-se inadequada a utilização de uma solução-mãe da qual se retiram alíquotas da solução em estudo em cada intervalo de amostragem, dado que não permite a análise da variabilidade dos dados e pode levar à contaminação da solução em estudo. Devem realizar-se ensaios de confirmação da esterilidade no final do ensaio de nível superior (90 % de hidrólise ou 30 dias). Todavia, estes ensaios não são necessários se não tiver sido observada qualquer transformação.

1.8.5.3. *Identificação dos produtos de hidrólise (Nível 3)*

Todos os principais produtos de hidrólise, designadamente os que representam um teor igual ou superior a 10 % da dose adicionada, devem ser identificados por métodos analíticos adequados.

1.8.5.4. *Ensaios facultativos*

As substâncias hidroliticamente instáveis poderão necessitar de ensaios complementares a valores de pH diversos de 4, 7 e 9. Para fins fisiológicos, por exemplo, poderá ser necessário efectuar um ensaio em condições mais ácidas (por exemplo, pH 1,2) a uma única temperatura fisiologicamente relevante (37 ^{o}C).

2. **DADOS**

Se pertinente, as quantidades de substâncias em estudo e produtos de hidrólise devem ser expressas em percentagem da concentração inicial adicionada e, se adequado, em mg/l, para cada intervalo de amostragem, cada pH e cada temperatura de ensaio. Além disso, no caso da utilização de uma substância marcada, deve apresentar-se um balanço de massa expresso em percentagem da concentração inicial adicionada.

Deve apresentar-se uma representação gráfica dos logaritmos das concentrações da substância em estudo em função do tempo. Os principais produtos de hidrólise (os que representem, pelo menos, 10 % da dose adicionada) devem ser identificados, procedendo-se à representação gráfica dos logaritmos das suas concentrações em função do tempo tal como no caso da substância de origem, de forma a evidenciar as suas velocidades de formação e transformação.

▼B

2.1. TRATAMENTO DOS RESULTADOS

É possível efectuar determinações mais precisas dos tempos de semitransformação ou dos parâmetros DT_{50} por recurso a cálculos com modelos cinéticos adequados. Devem comunicar-se, para cada pH e temperatura, os tempos de semitransformação e/ou os parâmetros DT_{50} (incluindo os limites de confiança), juntamente com uma descrição domodelo utilizado, a ordem cinética e o coeficiente de determinação (r^2). Se adequado, os cálculos deverão também abranger os produtos de hidrólise.

No caso do estudo de velocidades de reacção efectuados a temperaturas diferentes, as constantes de hidrólise de pseudoprimeira ordem (k_{obs}) devem ser descritas em função da temperatura. Os cálculos deverão basear-se, por um lado, na decomposição de k_{obs} em constantes de velocidade de hidrólise catalisada em meio ácido, neutro ou básico (k_H, k_{neutro} e k_{OH} respectivamente) e, por outro, na equação de Arrhenius:

$$k_{obs} = k_H[H^+] + k_{neutro} + k_{OH}[OH^-] = \sum_{i = H,neutro,OH} A_i e^{-B_i/T}$$

em que A_i e B_i são as constantes de regressão decorrentes, respectivamente, do declive e da ordenada na origem da linha mais adequada obtida por regressão linear ln k_i em função do inverso da temperatura absoluta, expressa em Kelvin (T). A aplicação da equação de Arrhenius à hidrólise catalisada em meio ácido, neutro e básico permite calcular as constantes de velocidade de pseudoprimeira ordem e, consequentemente, as meias vidas, para temperaturas às quais a determinação directa da constante de velocidade não é viável na prática (10).

2.2. AVALIAÇÃO E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

A maioria das reacções de hidrólise apresenta uma cinética aparente de primeira ordem, pelo que os tempos de semitransformação são independentes da concentração (ver a equação 4 do apêndice 2). Tal facto permite, em geral, a extrapolação dos resultados laboratoriais determinados com concentrações de 10^{-2}-10^{-3} M às condições ambientais (< 10^{-6} M) (10). Mabey e Mill (11) comunicaram vários exemplos de bom acordo entre as velocidades de hidrólise de diversas substâncias químicas determinadas em águas puras e naturais, a pH e temperaturas bem determinados.

3. **RELATÓRIOS**

3.1. RELATÓRIO DE ENSAIO

O relatório de ensaio deverá incluir, no mínimo, as seguintes informações:

Substância em estudo:

— denominação comum, denominação química, número CAS, fórmula estrutural (com indicação da posição marcada, caso se utilizem radioisótopos) e propriedades físico-químicas relevantes (ver a secção 1.5),

— pureza da substância (presença de impurezas),

— pureza declarada da substância marcada e respectiva actividade molar (se pertinente).

▼B

— Soluções-tampão:

— datas e pormenores de preparação,

— tampões e água utilizados,

— molaridade e pH das soluções-tampão.

Condições de ensaio:

— data da realização dos estudos,

— quantidade de substância em estudo adicionada,

— método e solventes (tipo e quantidade) utilizados para a adição da substância em estudo,

— volume de soluções tamponadas da substância em estudo incubadas,

— descrição do sistema de incubação utilizado,

— pH e temperatura durante o estudo,

— cronologia da colheita de amostras,

— método(s) de extracção,

— métodos de quantificação e identificação da substância em estudo e dos seus produtos de hidrólise nas soluções-tampão,

— número de amostras múltiplas.

Resultados:

— repetibilidade e sensibilidade dos métodos de análise utilizados,

— recuperações (apresentam-se na secção 1.7.1 os valores percentuais relativos a um ensaio válido),

— dados e médias respeitantes às amostras múltiplas, apresentados na forma de quadros,

— balanço de massas durante e no final do estudo (caso se utilize uma substância marcada),

— resultados do ensaio preliminar,

— discussão e interpretação dos resultados,

— dados e valores originais.

As informações que se seguem apenas são necessárias caso se determine a velocidade de hidrólise:

— representação gráfica das concentrações da substância em estudo e, se pertinente, dos produtos de hidrólise, em função do tempo, a cada pH e temperatura,

— tabelas de resultados da equação de Arrhenius à temperatura de 20 ^{o}C/25 ^{o}C,

— especificando o pH, a constante de velocidade [h^{-1} ou dia^{-1}], o tempo de semitransformação ou o DT50, as temperaturas [^{o}C], incluindo os limites de confiança e os coeficientes de correlação (r^2), ou dados similares,

— mecanismo de hidrólise proposto.

▼B

4. **REFERÊNCIAS**

(1) OECD (1981). Hydrolysis as a Function of pH. OECD Guideline for Testing of Chemicals Nr. 111, adoptado em 12 de Maio de 1981.

(2) US-Environmental Protection Agency (1982). 40 CFR 796.3500, Hydrolysis as a Function of pH at 25ºC. Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.

(3) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate Guidelines for registration of pesticides in Canada.

(4) União Europeia (UE) (1995). Directiva 95/36/CE da Comissão que altera a Directiva 91/414/CEE relativa à colocação dos produtos fitofarmacêuticos no mercado. Anexo V: destino e comportamento no ambiente.

(5) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1991). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

(6) BBA (1980). Merkblatt Nr. 55, Teil I und II: Prüfung des Verhaltens von Pflanzenbehandlungsmitteln im Wasser (Outubro de 1980).

(7) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.

(8) OECD (2000). Guidance document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures, OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No 23.

(9) OECD (1993). Guidelines for the Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994-2000): Addenda 6-11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.

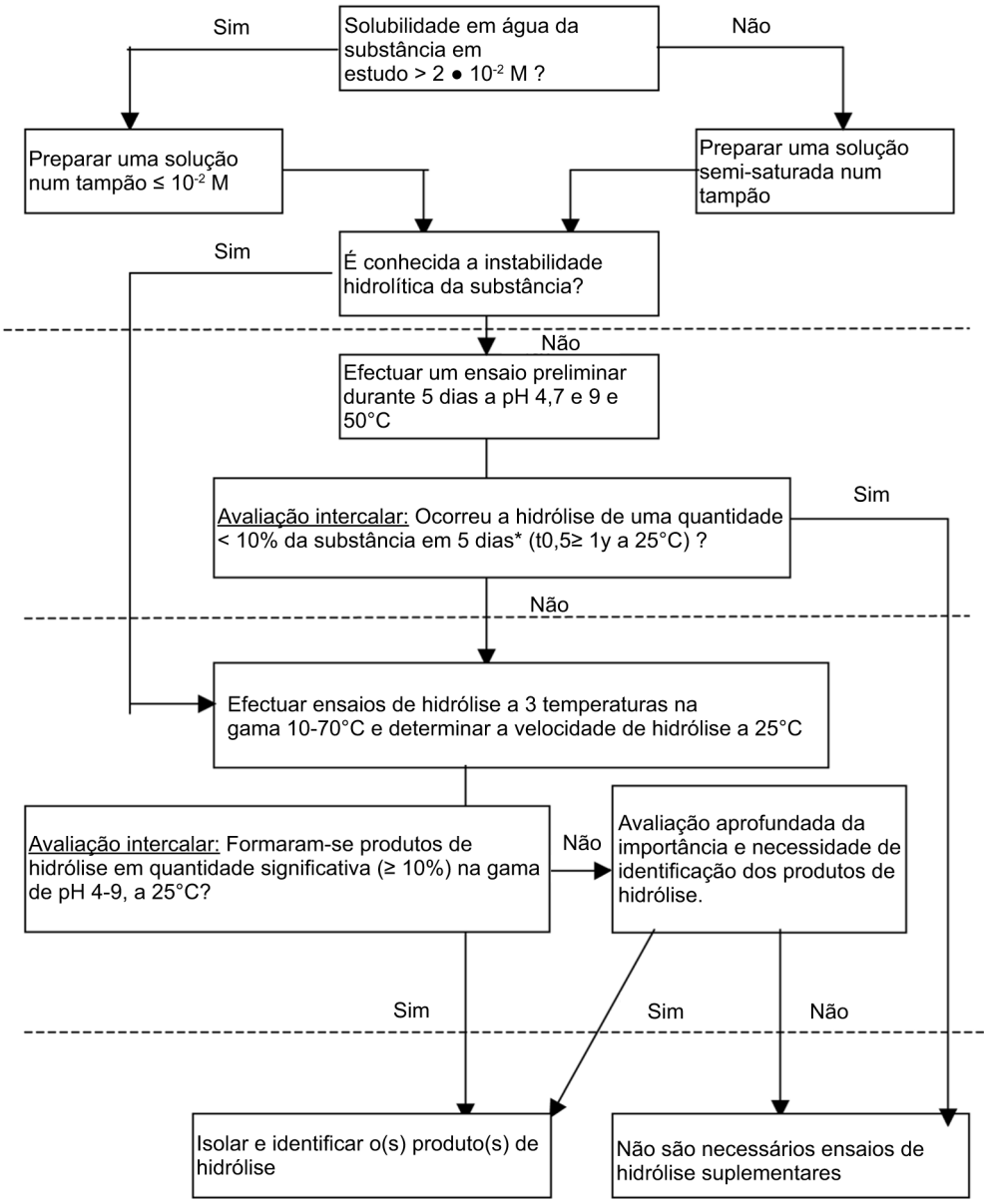
(10) Nelson, H, Laskowski D, Thermes S, and Hendley P. (1997) Recommended changes in pesticide fate study guidelines for improving input to computer models (texto de uma exposição oral no 14.º Encontro Anual da *Society of Environmental Toxicology and Chemistry,* Dallas TX, November 1993).

(11) Mabey, W. and Mill, T. (1978). Critical review of hydrolysis of organic compounds in water under environmental conditions. J. Phys. Chem. Ref. Data 7, 383-415.

▼B

Apêndice 1

Representação esquemática do ensaio de hidrólise progressivo



* 10 % de hidrólise da substância em estudo a 50 °C corresponde a um tempo de semi-transformação de cerca de 30 dias, equivalente a cerca de 1 ano a 25°C.

▼B

Apêndice 2

Definições e unidades

Devem usar-se sistematicamente **unidades do Sistema Internacional (SI).**

Substância em estudo: substância de origem ou produtos de transformação relevantes.

Produtos de transformação: quaisquer substâncias resultantes da transformação biótica ou abiótica da substância em estudo.

Produtos de hidrólise: quaisquer substâncias resultantes de reacções de transformação hidrolítica da substância em estudo.

Hidrólise: reacção de uma substância em estudo RX com água, com troca do grupo X com um grupo OH:

$$RX + HOH \rightarrow ROH + HX \qquad [1]$$

De forma simplificada, a velocidade de redução da concentração de RX é dada por

velocidade = k $[H_2O]$ [RX] reacção de segunda ordem

ou

velocidade = k [RX] reacção de primeira ordem

em função do passo determinante da velocidade. Uma vez que a água se encontra presente em grande excesso relativamente à substância em estudo, o tipo de reacção em causa é geralmente descrito como de pseudoprimeira ordem. A constante de velocidade observada é expressa do seguinte modo

$$k_{obs} = k\ [H_2O] \qquad [2]$$

e pode ser determinada por recurso à expressão (*)

$$k_{obs} = \frac{1}{t} \ln \frac{C_o}{C_t} \qquad [3]$$

em que

t = tempo

C_o, C_t = concentrações de RX nos instantes 0 e t.

A constante tem dimensões de $(\text{tempo})^{-1}$; o tempo de semitransformação (tempo necessário para a reacção de 50 % da substância RX) é dada por

$$t_{0,5} = \frac{\ln 2}{k_{obs}} \qquad [4]$$

Tempo de semitransformação: ($t_{0,5}$) tempo necessário à hidrólise de 50 % da substância em estudo, no caso de uma reacção com cinética de primeira ordem. É independente da concentração.

(*) Se a representação dos logaritmos das concentrações em função do tempo não for uma função linear (facto que traduz uma cinética de primeira ordem), o recurso à equação [3] não é adequado à determinação da constante de velocidade da hidrólise da substância em estudo.

▼B

DT_{50} (Tempo de semi-reacção): tempo necessário a uma redução de 50 % da concentração da substância em estudo. É diferente do tempo de semitransformação, $t_{0,5}$, se a reacção não apresentar uma cinética de primeira ordem.

Estimativa de k a uma temperatura diferente

Sempre que sejam conhecidas as constantes de velocidade a duas temperaturas, as constantes a outras temperaturas podem ser calculadas por recurso à equação de Arrhenius:

$$k = A \times e^{-\frac{E}{R \times T}} \text{ ou } \ln k = \frac{-E}{R \times T} + \ln A$$

Por representação de ln k em função de 1/T obtém-se uma recta com declive -E/R

em que:

k = constante de velocidade, determinada a temperaturas diferentes

E = energia de activação [kJ/mol]

T = temperatura absoluta [K]

R = constante dos gases [8,314 J/mol.K]

A energia de activação foi calculada por análise da seguinte equação por regressão linear:

$$E = R \times \frac{\ln k_2 - \ln k_1}{\left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}\right)}$$

em que: $T_2 > T_1$.

▼B

Apsêndice 3

Sistemas-tampão

A. **CLARK E LUBS:**

Misturas-tampão de CLARK e LUBS (*)

Composição	pH
0,2 N HCl E 0,2 N KCl A 20 °C	
47,5 ml HC1 + 25 ml KC1 dil. para 100 ml	1,0
32,25 ml HC1 + 25 ml KC1 dil. para 100 ml	1,2
20,75 ml HC1 + 25 ml KC1 dil. para 100 ml	1,4
13,15 ml HC1 + 25 ml KC1 dil. para 100 ml	1,6
8,3 ml HC1 + 25 ml KC1 dil. para 100 ml	1,8
5,3 ml HC1 + 25 ml KC1 dil. para 100 ml	2,0
3,35 ml HC1 + 25 ml KC1 dil. para 100 ml	2,2
0,1 M biftalato de potássio + 0,1 N HC1 a 20 °C	
46,70 ml 0,1 N HC1 + 50 ml biftalato dil. para 100 ml	2,2
39,60 ml 0,1 N HC1 + 50 ml biftalato dil. para 100 ml	2,4
32,95 ml 0,1 N HC1 + 50 ml biftalato dil. para 100 ml	2,6
26,42 ml 0,1 N HC1 + 50 ml biftalato dil. para 100 ml	2,8
20,32 ml 0,1 N HC1 + 50 ml biftalato dil. para 100 ml	3,0
14,70 ml 0,1 N HC1 + 50 ml biftalato dil. para 100 ml	3,2
9,90 ml 0,1 N HC1 + 50 ml biftalato dil. para 100 ml	3,4
5,97 ml 0,1 N HC1 + 50 ml biftalato dil. para 100 ml	3,6
2,63 ml 0,1 N HC1 + 50 ml biftalato dil. para 100 ml	3,8
0,1 M biftalato de potássio + 0,1 N NaOH a 20 °C	
0,40 ml 0,1 N NaOH +50 ml biftalato dil. para 100 ml	4,0
3,70 ml 0,1 N NaOH +50 ml biftalato dil. para 100 ml	4,2
7,50 ml 0,1 N NaOH +50 ml biftalato dil. para 100 ml	4,4
12,15 ml 0,1 N NaOH +50 ml biftalato dil. para 100 ml	4,6
17,70 ml 0,1 N NaOH +50 ml biftalato dil. para 100 ml	4,8

(*) Os valores de pH constantes dos quadros foram calculados com base em determinações potenciométricas, por recurso às equações-padrão de Sörensen (1909). Os valores de pH correspondentes são superiores em 0,04 aos valores constantes dos quadros.

▼B

Composição	pH
23,85 ml 0,1 N NaOH +50 ml biftalato dil. para 100 ml	5,0
29,95 ml 0,1 N NaOH +50 ml biftalato dil. para 100 ml	5,2
35,45 ml 0,1 N NaOH +50 ml biftalato dil. para 100 ml	5,4
39,85 ml 0,1 N NaOH +50 ml biftalato dil. para 100 ml	5,6
43,00 ml 0,1 N NaOH +50 ml biftalato dil. para 100 ml	5,8
45,45 ml 0,1 N NaOH +50 ml biftalato dil. para 100 ml	6,0
0,1 M fosfato monopotássico + 0,1 N NaOH a 20 °C	
5,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfato dil. para 100 ml	6,0
8,60 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfato dil. para 100 ml	6,2
12,60 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfato dil. para 100 ml	6,4
17,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfato dil. para 100 ml	6,6
23,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfato dil. para 100 ml	6,8
29,63 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfato dil. para 100 ml	7,0
35,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfato dil. para 100 ml	7,2
39,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfato dil. para 100 ml	7,4
42,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfato dil. para 100 ml	7,6
45,20 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfato dil. para 100 ml	7,8
46,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfato dil. para 100 ml	8,0
0,1 M H_3B0_3 em 0,1 M KCl + 0,1 N NaOH a 20 °C	
2,61 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ácido bórico dil. para 100 ml	7,8
3,97 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ácido bórico dil. para 100 ml	8,0
5,90 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ácido bórico dil. para 100 ml	8,2
8,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ácido bórico dil. para 100 ml	8,4
12,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ácido bórico dil. para 100 ml	8,6
16,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ácido bórico dil. para 100 ml	8,8
21,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ácido bórico dil. para 100 ml	9,0
26,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ácido bórico dil. para 100 ml	9,2

▼B

32,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ácido bórico dil. para 100 ml	9,4
36,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ácido bórico dil. para 100 ml	9,6
40,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ácido bórico dil. para 100 ml	9,8
43,90 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ácido bórico dil. para 100 ml	10,0

B. **KOLTHOFF AND VLEESCHHOUWER:**

Tampões de citrato de KOLTHOFF e VLEESCHHOUWER

Composição	pH
0,1 M citrato monopotássico e 0,1 N HCl a 18 °C (*)	
49,7 ml 0,1 N HC1 + 50 ml citrato dil. para 100 ml	2,2
43,4 ml 0,1 N HC1 + 50 ml citrato dil. para 100 ml	2,4
36,8 ml 0,1 N HC1 + 50 ml citrato dil. para 100 ml	2,6
30,2 ml 0,1 N HC1 + 50 ml citrato dil. para 100 ml	2,8
23,6 ml 0,1 N HC1 + 50 ml citrato dil. para 100 ml	3,0
17,2 ml 0,1 N HC1 + 50 ml citrato dil. para 100 ml	3,2
10,7 ml 0,1 N HC1 + 50 ml citrato dil. para 100 ml	3,4
4,2 ml 0,1 N HC1 + 50 ml citrato dil. para 100 ml	3,6
0,1 M citrato monopotássico e 0,1 N NaOH a 18 °C (*)	
2,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrato dil. para 100 ml	3,8
9,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrato dil. para 100 ml	4,0
16,3 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrato dil. para 100 ml	4,2
23,7 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrato dil. para 100 ml	4,4
31,5 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrato dil. para 100 ml	4,6
39,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrato dil. para 100 ml	4,8
46,7 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrato dil. para 100 ml	5,0
54,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrato dil. para 100 ml	5,2
61,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrato dil. para 100 ml	5,4
68,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrato dil. para 100 ml	5,6
74,4 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrato dil. para 100 ml	5,8
81,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrato dil. para 100 ml	6,0

(*) Deve adicionar-se um pequeno cristal de timol ou de uma substância afim para evitar a formação de depósitos molds.

▼B

C. **SÖRENSEN:**

Misturas de boratos de SÖRENSEN

Composição		Sörensen 18 °C	Walbum, pH a		
ml Borax	ml HC1/NaOH		10 °C	40 °C	70 °C
0,05 M borax + 0,1 N HCl					
5,25	4,75	7,62	7,64	7,55	7,47
5,50	4,50	7,94	7,98	7,86	7,76
5,75	4,25	8,14	8,17	8,06	7,95
6,00	4,00	8,29	8,32	8,19	8,08
6,50	3,50	8,51	8,54	8,40	8,28
7,00	3,00	8,08	8,72	8,56	8,40
7,50	2,50	8,80	8,84	8,67	8,50
8,00	2,00	8,91	8,96	8,77	8,59
8,50	1,50	9,01	9,06	8,86	8,67
9,00	1,00	9,09	9,14	8,94	8,74
9,50	0,50	9,17	9,22	9,01	8,80
10,00	0,00	9,24	9,30	9,08	8,86
0,05 M borax + 0,1 N NaOH					
10,0	0,0	9,24	9,30	9,08	8,86
9,0	1,0	9,36	9,42	9,18	8,94
8,0	2,0	9,50	9,57	9,30	9,02
7,0	3,0	9,68	9,76	9,44	9,12
6,0	4,0	9,97	10,06	9,67	9,28

Misturas de fosfatos de SÖRENSEN

Composição	pH
0,0667 M fosfato monopotássico + 0,0667 M fosfato dissódico a 20°C	
99,2 ml KH_2PO_4 + 0,8 ml Na_2HPO_4	5,0
98,4 ml KH_2PO_4 + 1,6 ml Na_2HPO_4	5,2
97,3 ml KH_2PO_4 + 2,7 ml Na_2HPO_4	5,4
95,5 ml KH_2PO_4 + 4,5 ml Na_2HPO_4	5,6
92,8 ml KH_2PO_4 + 7,2 ml Na_2HPO_4	5,8
88,9 ml KH_2PO_4 + 11,1 ml Na_2HPO_4	6,0
83,0 ml KH_2PO_4 + 17,0 ml Na_2HPO_4	6,2
75,4 ml KH_2PO_4 + 24,6 ml Na_2HPO_4	6,4
65,3 ml KH_2PO_4 + 34,7 ml Na_2HPO_4	6,6

▼B

53,4 ml KH_2PO_4 + 46,6 ml Na_2HPO_4	6,8
41,3 ml KH_2PO_4 + 58,7 ml Na_2HPO_4	7,0
29,6 ml KH_2PO_4 + 70,4 ml Na_2HPO_4	7,2
19,7 ml KH_2PO_4 + 80,3 ml Na_2HPO_4	7,4
12,8 ml KH_2PO_4 + 87,2 ml Na_2HPO_4	7,6
7,4 ml KH_2PO_4 + 92,6 ml Na_2HPO_4	7,8
3,7 ml KH_2PO_4 + 96,3 ml Na_2HPO_4	8,0

▼B

C.8. **TOXICIDADE EM RELAÇÃO ÀS MINHOCAS**

ENSAIO UTILIZANDO SOLO ARTIFICIAL

1. **MÉTODO**

1.1. INTRODUÇÃO

Neste ensaio laboratorial, a substância de ensaio é adicionada a um solo artificial no qual são colocadas minhocas durante 14 dias. Após este período (e, facultativamente, após 7 dias) examina-se o efeito letal da substância nas minhocas. O ensaio fornece um método para a avaliação, num prazo relativamente curto, do efeito dos produtos químicos nas minhocas, por absorção via cutânea e alimentar.

1.2. DEFINIÇÃO E UNIDADE

Cl_{50}: a concentração de uma substância que se considera responsável pela morte de 50 % dos animais de ensaio durante o período de ensaio.

1.3. SUBSTÂNCIA DE REFERÊNCIA

É utilizada periodicamente uma substância de referência com o objectivo de demonstrar que a sensibilidade do sistema de ensaio não variou significativamente.

Recomenda-se como substância de referência a cloroacetamida de pureza analítica.

1.4. PRINCÍPIO DO MÉTODO

O solo constitui um meio variável e, por essa razão, é utilizado neste ensaio um solo franco artificial cuidadosamente definido. As minhocas adultas da espécie *Eisenia foetida* (ver nota em apêndice) são mantidas num solo artificial, tratado com diferentes concentrações da substância de ensaio. O conteúdo dos recipientes é espalhado sobre um tabuleiro 14 dias (e facultativamente sete dias) após o início do ensaio e contam-se as minhocas sobreviventes, para cada uma das concentrações.

1.5. CRITÉRIOS DE QUALIDADE

Pretende-se que o ensaio seja o mais reprodutível possível no que diz respeito ao substrato e ao organismo a ensaiar. A mortalidade nos controlos não deve exceder 10 % no termo do ensaio, caso contrário este não é válido.

1.6. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.6.1. *Materiais*

1.6.1.1. Substrato para o ensaio

É utilizado como substrato de base para o ensaio um solo artificial de constituição bem definida.

a) Substrato de base (as percentagens são expressas em termos de peso seco):

— 10 % de turfa de esfagno (tão próximo quanto possível do pH 5,5 - 6,0, sem resíduos vegetais visíveis e finamente moído),

▼B

— 20 % de argila caulinítica, de preferência com mais de 50 % de caulinite,

— cerca de 69 % de areia industrial com quartzo (predominância de areia fina com mais de 50 % de partículas de granulometria 0,05 - 0,2 mm). Se a substância não for suficientemente dispersível em água, é necessário dispor de 10 g por recipiente de ensaio para misturar posteriormente com a substância de ensaio,

— cerca de 1 % de carbonato de cálcio ($CaCO_3$) pulverizado e quimicamente puro para ajustar o pH a 6,0 ± 0,5;

b) Substrato para o ensaio

O substrato para o ensaio contém substrato de base, a substância de ensaio e água desionizada.

O teor em água deve corresponder a cerca de 25-42 % do peso seco do substrato de base. O teor em água do substrato determina-se por secagem da amostra a 105°C até se obter um peso constante. O critério-chave é que o solo artificial seja humedecido até à sua saturação. Deve-se proceder à sua mistura cuidadosamente de modo a obter uma distribuição uniforme da substância de ensaio e do substrato. Deve ser referido o modo como é introduzida a substância de ensaio no substrato;

c) Substrato de controlo

O substrato de controlo contém o substrato de base e água. Se se utilizar um aditivo, um substrato de controlo suplementar deverá conter idêntica quantidade do aditivo.

1.6.1.2. Recipientes de ensaio

Recipientes em vidro, com uma capacidade aproximada de um litro (adequadamente cobertos com tampas de plástico, discos ou filme de plástico perfurados para efeitos de ventilação) cheios com uma dada quantidade de substrato húmido para ensaio ou substrato de controlo, equivalente a 500 g de substrato seco.

1.6.2. *Condições do ensaio*

Os recipientes devem ser mantidos em câmaras climatizadas a uma temperatura de 20 ± 2°C com luz contínua. A intensidade da luz deve situar-se entre 400 e 800 luz.

A duração do ensaio é de 14 dias, mas pode-se optar por avaliar a mortalidade após terem decorrido 7 dias desde o início do ensaio.

1.6.3. *Método de ensaio*

Concentrações de ensaio

As concentrações da substância de ensaio são expressas em peso de substância por unidade de peso seco do substrato de base (mg/kg).

Ensaio de determinação de concentrações

O intervalo de concentrações susceptível de provocar mortalidades de zero a 100 % pode ser determinado num ensaio de determinação de concentrações, com o objectivo de fornecer informações relativas ao intervalo de concentrações a utilizar no ensaio definitivo.

▼B

A substância deve ser ensaiada nas seguintes concentrações: 1 000; 100; 10; 1; 0,1 mg substância/kg de substratode ensaio (peso seco).

Se se efectuar um ensaio definitivo completo, um meio de ensaio por cada concentração e um meio para o controlo não tratado, cada um dos quais com dez minhocas, pode ser suficiente para o ensaio de determinação de concentrações.

Ensaio definitivo

Os resultados do ensaio de determinação de concentrações são utilizados para escolher pelo menos cinco concentrações segundo uma série geométrica que provoquem uma mortalidade de 0 a 100 %, diferindo entre si de um factor constante não superior a 1,8.

Um ensaio que utilize estas séries de concentração deve permitir avaliar com a maior precisão possível o valor de CL_{50} e os respectivos limites de confiança.

No ensaio definitivo utilizam-se pelo menos quatro meios de ensaio por concentração e quatro meios de controlo sem tratamento, cada um deles com dez minhocas. Os resultados das repetições destes meios são expressos em termos de média e desvio padrão.

Quando duas concentrações consecutivas, com uma razão de 1,8 entre si, dão apenas mortalidades de 0 % e 100 %, esses dois valores são suficientes para determinar o intervalo em que se situa a $CL_{5()}$.

Mistura do substrato de base para o ensaio e da substância de ensaio

5empre que possível, o substrato para o ensaio deve ser preparado sem quaisquer aditivos além de água. Prepara-se uma emulsão ou dispersão da substância de ensaio em água desionizada ou outro solvente e, imediatamente antes do início do ensaio, mistura-se com o substrato de base para o ensaio, ou pulveriza-se uniformemente sobre ele, com um dispositivo de pulverização para cromatografia fina ou outro semelhante.

Se a substância de ensaio for insolúvel em água, pode ser dissolvida num determinado volume, o mais pequeno possível, de um solvente orgânico adequado (por exemplo, hexano, acetona ou clorofórmio).

Para solubilizar, dispersar ou emulsionar a substância de ensaio apenas se podem utilizar agentes que se volatilizem facilmente. O substrato para o ensaio deve ser arejado antes de ser utilizado. A quantidade de água evaporada deve ser substituída. O controlo deve conter a mesma quantidade de qualquer aditivo.

Se a substância de ensaio não for solúvel, dispersível ou emulsionável, em solventes orgânicos, misturam-se 490 g de substrato de ensaio seco com 10 g de uma mistura de areia fina com quartzo e uma quantidade de substância de ensaio correspondente à dose necessária para tratar 500 g de solo artificial seco.

Para cada meio de ensaio, são colocados, em cada recipiente de vidro, uma dada quantidade de substrato húmido para o ensaio, equivalente a 500 g de peso seco e, sobre a superfície do substrato para o ensaio, 10 minhocas. Estas minhocas foram acondicionadas durante 24 horas num substrato de base húmido semelhante ao de ensaio, após o que foram rapidamente lavadas e a água em excesso absorvida com um papel de filtro antes da utilização.

▼B

Os recipientes são cobertos com tampas de plástico, discos ou filmes de plástico perfurados para evitar que o substrato seque e são mantidos nas condições de ensaio durante 14 dias.

A avaliação deve ser efectuada 14 dias (e facultativamente sete dias) após o início do ensaio. O substrato é espalhado sobre uma placa de vidro ou aço inoxidável. Examinam-se então as minhocas e determina-se o número de sobreviventes. Considera-se que as minhocas estão mortas se não reagirem a um ligeiro estímulo mecânico aplicado na extremidade frontal.

Quando o exame é efectuado no 7.º dia, o recipiente enche-se novamente com substrato e as minhocas sobreviventes são de novo colocadas na mesma superfície do substrato de ensaio.

1.6.4. *Organismos a utilizar no ensaio*

Os organismos a utilizar no ensaio devem ser adultos da espécie *Eisenia foetida* (ver nota em apêndice) (pelo menos com 2 meses de vida e com clitelo), com peso húmido de 300 a 600 mg (ver método de reprodução em apêndice).

2. **DADOS**

2.1. PROCESSAMENTO E AVALIAÇÃO DE RESULTADOS

As concentrações da substância de ensaio apresentam-se em função das percentagens correspondentes de minhocas mortas.

Quando os dados são adequados, o valor CL_{50} e os limites de confiança (p = 0,05) devem ser determinados utilizando métodos padrão *(Litchfield e Wilcoxon,* 1949, ou método equivalente). O valor CL_{50} deve ser expresso em mg de substância de ensaio por kg de substrato de ensaio (peso seco).

Nos casos em que o declive da curva de concentrações é demasiado abrupto para permitir o cálculo da CL_{50}, é suficiente uma estimativa gráfica deste valor.

Quando duas concentrações consecutivas com uma razão de 1,8 entre si provocam 0 % e 100 % de mortalidade, estes dois valores são suficientes para indicar o intervalo entre o qual se situa a CL_{50}.

3. **RELATÓRIO**

3.1. RELATÓRIO DO ENSAIO

O relatório do ensaio deve incluir, se possível, as seguintes informações:

— referir se o ensaio foi efectuado de acordo com os critérios de qualidade acima mencionados,

— tipo de ensaio (ensaio de determinação de concentrações e/ou ensaio definitivo),

— descrição exacta das condições de ensaio ou referir se o ensaio foi efectuado de acordo com o método; devem ser referidos todos os desvios em relação ao método indicado,

— descrição exacta do modo como a substância de ensaio foi misturada com o substrato de base para o ensaio,

— informações relativas aos organismos utilizados no ensaio (espécie, idade, peso médio e intervalo de variação do peso, condições de reprodução e manutenção, fornecedor),

▼B

— método utilizado na determinação da CL_{50},

— resultados dos ensaios, incluindo todos os dados utilizados,

— descrição dos sintomas ou alterações do comportamento observados nos organismos utilizados no ensaio,

— mortalidade nos controlos,

— CL_{50} ou a mais elevada concentração ensaiada que não provocou mortalidade e a concentração ensaiada mais baixa que provocou urna mortalidade de 100 %, catorze dias (e facultativamente sete dias) após o início do ensaio,

— representação gráfica da curva concentração-resposta,

— resultados obtidos com a substância de referência quer em relação ao presente ensaio quer provenientes de anteriores ensaios de controlo de qualidade.

4. **REFERÊNCIAS**

(1) OCDE, Paris, 1981, *Test Guideline 207,* Decisão C(81) 30 final do Conselho.

(2) Edwards, C. A. and Lofty, J. R. *Biology of Earthworms,* Chapman and Hall, London, 331 pp.

(3) Bouche, M. B., 1972, *Lombriciens de France, Ecologie et Systematique,* Institut National de la Recherche Agronomique, 671 pp.

(4) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F., A simplified method of evaluating dose effect experiments, *J. Pharm. Exp. Therap.,* vol. 96, 1949, p. 99.

(5) Comissão das Comunidades Europeias, *Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicology of chemical substances to earthworms,* Report EUR 8714 EN, 1983.

(6) Umweltbundesamt/Biologische Bundesanstalt fur Land- und Forstwirtschaft, Berlin, 1984, Verfahrens-vorschlag «Toxizitätstest am Regenwurm *Eisenia foetida* in künstlichem Boden», in: Rudolph/Boje, *Ökotoxikologie,* ecomed. Landsberg, 1986.

▼B

Apêndice

Reprodução e manutenção das minhocas antes do ensaio

Para reproduzir os animais, colocar 30 a 50 minhocas adultas numa caixa de reprodução com substrato fresco e removê-las ao fim de 14 dias,.Estes animais podem ser utilizados para futuros lotes de reprodução. As posturas são utilizadas no ensaio quando atingirem a maturidade (nos termos das condições determinadas, ao fim de 2 a 3 meses).

Condições de reprodução e manutenção

Câmara climatizada:	temperatura 20 ± 2 °C, de preferência dispondo de luz contínua (de intensidade 400 a 800 lux).
Caixas de reprodução:	recipientes adequados de pequena profundidade, com um volume de 10 a 20 1.
Substrato:	*Eisenia foetida* pode ser criada em vários excrementos animais. Recomenda-se como meio de reprodução a utilização de uma mistura de 50 % de turfa e 50 % de estrume de cavalo ou vaca. O meio deve ter um pH de aproximadamente 6 a 7 (ajustado com carbonato de cálcio) e baixa condutividade iónica (inferior a 6 mmhos ou 0,5 % de concentração de sais). O substrato deve ser húmido, mas não demasiado molhado. Além do método acima referido, podem ser utilizados com êxito outros processos.

Nota: *Eisenia foetida* existe sob a forma de duas subespécies que alguns taxionomistas separaram em espécies (Bouche, 1972). São morfologicamente semelhantes mas uma delas, a *Eisenia foetida foetida,* apresenta como característica listas ou bandas transversais sobre os segmentos e a outra, a *Eisenia foetida andrei,* não possui tal característica, apresentando uma coloração avermelhada matizada. Sempre que possível, deve-se utilizar a *Eisenia foetida andrei.* Podem ser utilizadas outras espécies desde que se disponha da necessária metodologia.

▼B

C.9. BIODEGRADAÇÃO

ENSAIO DE ZAHN E WELLENS

1. MÉTODO

1.1. INTRODUÇÃO

O objectivo do presente método é a avaliação da biodegradação final potencial de substâncias orgânicas, não voláteis, solúveis em água quando são expostas a concentrações relativamente elevadas de microorganismos num ensaio estático.

Pode-se verificar adsorção físico-química sobre os sólidos em suspensão, o que deve ser tomado em consideração na interpretação dos resultados (ver 3.2),

As substâncias a estudar são utilizadas em concentrações que correspondem a valores de COD que vão de 50 a 400 mg/litro ou a valores de CQO situados entre 100 e 1 000 mg/l (COD = carbono orgânico dissolvido; CQO = carência química de oxigénio). Estas concentrações relativamente elevadas asseguram uma boa confiança analítica. Os compostos dotados de propriedades tóxicas podem atrasar ou inibir o processo de degradação.

No presente método, utiliza-se a medição da concentração do carbono orgânico dissolvido ou a carência química de oxigénio para avaliar a biodegradação final da substância de ensaio.

A utilização simultânea de um método analítico específico pode permitir a avaliação da biodegradação primária da substância (desaparecimento da estrutura química inicial).

O método apenas se aplica às substâncias orgânicas que, na concentração utilizada no ensaio:

— são solúveis em água nas condições do ensaio,

— têm uma pressão de vapor negligenciável nas condições do ensaio,

— não exercem efeitos inibidores sobre as bactérias,

— não sofrem uma adsorção importante pelo equipamento de ensaio,

— não desaparecem da solução de ensaio devido a formação de espuma.

Na interpretação dos resultados obtidos, especialmente nos casos em que estes resultados são baixos ou marginais, é útil conhecer as proporções relativas dos principais elementos constituintes da substância de ensaio.

Na interpretação de resultados pouco elevados e na selecção das concentrações de ensaio adequadas, é desejável dispor de informações relativas à toxicidade da substância em relação aos microorganismos.

▼B

1.2. DEFINIÇÕES E UNIDADES

A taxa de degradação alcançada no final do ensaio constitui a «Biodegradação no ensaio de Zahn e Wellens»:

$$D_T(\%) = \left[1 - \frac{(C_T - C_B)}{(C_A - C_{BA})}\right] \times 100$$

em que:

D_T = biodegradação (%) no instante T.

C_A = Valores do COD (ou da CQO) da mistura de ensaio medidos três horas após o início do ensaio (mg/l) (COD = carbono orgânico dissolvido, CQO = carência química do oxigénio),

C_T = valores do COD ou da CQO na mistura do ensaio no momento da colheita da amostra (mg/l),

C_B = valor do COD ou da CQO do ensaio em branco no momento da colheita da amostra,

C_{BA} = valor do COD ou da CQO do ensaio em branco, medido três horas após o início do ensaio (mg/l).

A taxa de degradação obtida é arredondada até ao valor inteiro da percentagem mais próxima.

A percentagem de degradação é definida como sendo a percentagem de remoção de COD (ou da CQO) da substância de ensaio.

A diferença entre o valor medido após 3 horas e o valor inicial calculado ou de preferência, medido, pode fornecer informações úteis relativas à eliminação da substância (ver 3.2, Interpretação dos resultados).

1.3. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

No estudo de novas substâncias, podem por vezes ser úteis substâncias de referencia; contudo, ainda não podem ser recomendadas substâncias de referência específicas.

1.4. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

Colocam-se num recipiente de vidro de 1 a 4 litros de capacidade, munida de um agitador e de um arejador, uma solução aquosa de lamas activadas, substâncias nutritivas minerais e a substância de ensaio que constituem a única fonte de carbono. A mistura é agitada e arejada a uma temperatura de 20 a 25°C, sob uma iluminação difusa ou numa câmara escura durante um período que pode ir até vinte e oito dias. Acompanha-se o processo de degradação determinando o valor do COD (ou da CQO) na solução filtrada, diariamente ou segundo uma outra periodicidade adequada. Após cada período, o COD (ou a CQO) eliminado é referido ao valor verificado três horas após o início do ensaio e expresso em percentagem de biodegradação; isto constitui a medida da taxa de degradação nesse momento. O resultado é representado graficamente em função do tempo, o que permite obter a curva de biodegradação.

Se se utiliza um método analítico específico, podem-se medir as variações da concentração da molécula original atribuíveis à biodegradação (biodegradação primária).

▼B

1.5. CRITÉRIOS DE QUALIDADE

A reprodutibilidade do presente método foi provada num ensaio de intercalibração.

A sensibilidade do método é largamente determinada pela variabilidade do ensaio em branco e, em menor extensão, pela precisão da determinação do carbono orgânico dissolvido e da concentração da substância de ensaio no meio.

1.6. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.6.1. *Preparações*

1.6.1.1. Reagentes

Água utilizada no ensaio: água de beber contendo menos de 5 mg/l de carbono orgânico. A concentração total de iões, cálcio e magnésio não deve ultrapassar 2,7 mmoles/l; se não for o caso, corrigir a diluição com a necessária quantidade de água desionizada ou destilada.

Acido sulfúrico de pureza analítica (P.A.): 50 g/l.

Solução de hidróxido de sódio P.A.: 40 g/l.

Solução nutritiva mineral: dissolver num litro de água desionizada:

cloreto de amónio, NH_4Cl, P.A.: 38,50 g,

dihidrogenofosfato de sódio, $NaH_2PO_4.2H_20$, P.A.: 33,40 g,

dihidrogenofosfato de potássio KH_2PO_4, P.a.: 8,50 g,

monohidrogenofosfato de dipotássio K_2HPO_4, P.A.: 21,75 g.

A mistura serve simultaneamente de meio nutritivo e solução tampão.

1.6.1.2. Equipamento

Recipientes de vidro com uma capacidade de 1 a 4 litros (por exemplo, recipientes cilíndricos).

Dispositivos de agitação com um agitador em vidro ou em metal fixado a uma haste adequada (o agitador deve descrever um movimento rotativo a cerca de 5 a 10 cm do fundo do recipiente). Pode-se utilizar igualmente um agitador magnético com 7 a 10 cm de comprimento.

Tubo de arejamento em vidro com 2 a 4 mm do diâmetro interno. A abertura do tubo deve situar-se cerca de 1 cm acima do fundo do recipiente.

Centrífuga (cerca de 3 550 g).

Potenciómetro.

Aparelho para a medição do oxigénio dissolvido.

Papéis de filtro.

▼B

Aparelho de filtração por membrana.

Membranas filtrantes de porosidade 0,45 μm. As membranas filtrantes são adequadas se não libertarem carbono e não absorverem a substância na fase da filtração.

Material de análise para a dosagem do carbono orgânico e a determinação da carência química de oxigénio.

1.6.1.3. Preparação do inóculo

Lavar as lamas activadas provenientes de uma estação de tratamento biológica por sucessivas centrifugações ou decantações com água do ensaio (ver acima).

As lamas activadas devem possuir as características adequadas. Esta lama pode ser obtida numa estação de tratamento de águas residuais em boas condições de funcionamento. Para dispor do maior número possível de diferentes espécies ou de estirpes de bactérias, pode ser preferível misturar os inóculos provenientes de diferentes fontes (por exemplo, de diferentes estações de tratamento, extractos de solo, água de rios, etc.). A mistura deve ser tratada tal como é acima indicado.

Para o controlo da actividade das lamas activadas, ver abaixo «Controlo funcional».

1.6.1.4. Preparação das soluções de ensaio

Num recipiente de ensaio, adicionar 500 ml de água de ensaio, 2,5 ml/l de solução mineral nutritiva e uma quantidade de lamas activadas correspondente a 0,2 a 1,0 g/l de matéria seca na mistura final. Adicionar uma quantidade suficiente de solução de reserva da substância de ensaio de modo a obter, na mistura final, uma concentração de COD de 50 a 400 mg/l. Os valores correspondentes de CQO são 100 a 1 000 mg/l. Adicionar água até um volume total de 1 a 4 litros. O volume total escolhido depende do número de amostras a colher para a determinação do COD ou da CQO e do volume necessário para a análise.

Normalmente consideram-se dois litros como o volume satisfatório. Para cada série de ensaios, preparar pelo menos um recipiente controlo (branco) contendo apenas as lamas activadas e a solução mineral nutritiva, diluídas com água de ensaio, até se dispor de um volume total idêntico ao dos recipientes de ensaio.

1.6.2. *Execução do ensaio*

Agitam-se os recipientes de ensaio com agitadores magnéticos ou agitadores a hélice, sob iluminação difusa ou numa câmara escura, a uma temperatura de 20 a 25°C. O arejamento processa-se por injecção de ar comprimido purificado por um filtro de algodão em rama e, se necessário, por um frasco de lavagem. Deve-se garantir que a lama não se deposite e que a concentração de oxigénio não desça abaixo de 2 mg/l,

O valor de pH deve ser verificado a intervalos regulares (por exemplo, diariamente) e ajustado a pH 7 a 8, se necessário.

▼B

As perdas devidas a evaporação são compensadas, imediatamente antes de cada colheita de amostras, com água desionizada ou destilada nas quantidades adequadas. Um bom método consiste em marcar o nível do líquido no recipiente antes de dar início ao ensaio. Após cada colheita, marcam-se de novo os recipientes (sem arejamento nem agitação). As primeiras amostras são sempre colhidas três horas após o início do ensaio, de modo a permitir detectar uma adsorção da substância de ensaio pelas lamas activadas.

À degradação da substância de ensaio segue-se a dosagem do COD ou da CQO, diariamente, ou a outro intervalo regular. Filtrar as amostras provenientes do recipiente de ensaio e do recipiente de controlo (branco) através de um papel de filtro cuidadosamente lavado. Rejeitar os primeiros 5 ml do filtrado da solução de ensaio. As lamas dificilmente filtráveis podem ser previamente eliminadas por uma centrifugação de 10 minutos. As determinações do COD e da CQO efectuam-se pelo menos em duplicado. A duração dos ensaios prolonga-se até 28 dias.

Observação: As amostras que permanecem turvas são filtradas através de filtros de membrana. Estes não devem libertar nem adsorver matérias orgânicas.

Controlo funcional de lamas activadas

Por cada série de ensaios é necessário prever um recipiente que contenha uma substância conhecida de forma a poder verificar a capacidade funcional de lamas activadas. O dietilcnoglicol revelou-se útil para este efeito.

Adaptação

Se as análises são efectuadas a intervalos relativamente curtos (por exemplo, diariamente), a curva de degradação pode fazer salientar claramente um fenómeno de adaptação (ver figura 2). O ensaio não deverá, portanto, ser iniciado imediatamente antes de um fim-de-semana.

Se a adaptação tem lugar nos últimos dias do ensaio, este deve ser prolongado até à degradação completa.

Observação: Se for necessário um melhor conhecimento do comportamento da lama, as mesmas lamas activadas são expostas de novo à mesma substância de ensaio de acordo com o seguinte processo:

Parar o agitador e o arejador e deixar precipitar as lamas activadas. Retirar o sobrenadante, encher com água de ensaio até perfazer dois litros, agitar durante 15 minutos e deixar de novo precipitar. Retirar de novo o sobrenadante e utilizar as restantes lamas para repetir o ensaio com a mesma substância, em conformidade com os pontos 1.6.1.4 e 1.6.2 anteriores. As lamas activadas podem igualmente ser separadas por centrifugação em vez de precipitação.

As lamas adaptadas podem ser misturadas com as lamas frescas para atingir 0,2 a 1 g de matéria seca/litro.

▼B

Análises

De um modo geral as amostras são filtradas através de um papel de filtro cuidadosamente lavado com água desionizada.

As amostras que permanecem turvas são filtradas através de filtros de membrana (0,45 μm).

Determinar a concentração de COD em duplicado nos filtrados das amostras (rejeitar os primeiros 5 ml) com o auxílio de um aparelho de medição do TOC. Se a análise do filtrado não puder ser efectuada no próprio dia, conservá-la no frigorífico até ao dia seguinte. Não é aconselhável conservá-la mais tempo.

Determinar a concentração da CQO nos filtrados das amostras com o auxílio do dispositivo de análise da CQO, em conformidade com o procedimento descrito no ponto 2 seguinte.

2. **RESULTADOS E AVALIAÇÃO**

Proceder a, pelo menos, duas determinações da concentração do COD e da CQO nas amostras, em conformidade com as indicações acima fornecidas em 1.6.2. Calcular a percentagem de degradação no instante T de acordo com a fórmula (com as suas definições) dada no ponto 1.2 anteriormente indicado.

Arredondar a taxa de degradação até à unidade de percentagem mais próxima. A taxa de degradação atingida no final do ensaio constitui a «Biodegradação no ensaio de Zahn-Wellens».

Observação: Se se realiza a degradação completa antes do final da duração do ensaio e se este resultado for confirmado por uma segunda análise efectuada no dia seguinte, pode-se dar o ensaio por concluído.

3. **RELATÓRIO**

3.1. RELATÓRIO DO ENSAIO

O relatório do ensaio, deve incluir, se possível, as seguintes informações:

— a concentração inicial da substância,

— quaisquer outras indicações e os resultados experimentais relativos à substância ensaiada, à substância de referência eventualmente usada e ao ensaio de controlo (branco),

— a concentração após três horas,

— a curva de biodegradação com a respectiva descrição,

— a data e o local de colheita dos organismos de ensaio, fase de adaptação, concentração utilizada, etc.,

— as razões científicas de eventuais alterações ao método de ensaio.

3.2. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

A eliminação do COD (ou da CQO) que se produz gradualmente durante um determinado número de dias ou de semanas indica que a substância ensaiada se degrada biologicamente.

▼B

Contudo, uma adsorção físico-química pode desempenhar um papel em determinados casos, o que é indicado quando se verifica uma remoção total ou parcial da substância desde o início, durante as primeiras três horas, e a diferença entre os licores sobrenadantes de ensaio e de controlo permanecem a um nível inesperadamente baixo.

São necessários ensaios suplementares se se pretender estabelecer a distinção entre biodegradação (ou biodegradação parcial) e adsorção.

Existem diversos métodos para estabelecer tal distinção, sendo o melhor a utilização do sobrenadante como inóculo num ensaio preliminar (de preferência um ensaio respirométrico).

As substâncias de ensaio que conduzem a uma elevada remoção neste ensaio, não associada à adsorção do COD (ou do CQO), devem ser consideradas como potencialmente biodegradáveis. Uma eliminação parcial, não associada à adsorção, indica que o produto químico é, pelo menos, biodegradável em determinada extensão. Uma eliminação baixa ou nula de COD (ou de CQO) pode ser atribuída à inibição dos microorganismos pela substância ensaiada, o que pode ser também revelado pela lise e perda de lamas, dando origem a sobrenadantes turvos. O ensaio deve ser repetido utilizando uma menor concentração da substância de ensaio.

A utilização de um método analítico específico em relação a um composto ou de uma substância de ensaio marcada com ^{14}C pode permitir uma maior sensibilidade. No caso dos compostos marcados com ^{14}C, a recuperação do $^{14}CO_2$ confirmará que se verificou biodegradação.

Quando os resultados se exprimem em termos de biodegradação primária, deve ser dada, se possível, uma explicação relativa à modificação de estrutura química que conduz a uma diminuição da resposta da substância original.

A validade do método analítico deve ser acompanhada da indicação da resposta encontrada no ensaio de controlo (branco).

4. **REFERÊNCIAS**

(1) OCDE, Paris, 1981, T*est Guideline 302* B, Decisão C(81) 30 final do Conselho.

(2) Annex V C.9 Degradation: Chemical Oxygen Demand, Directiva 84/449/CEE da Comissão (JO L 251 de 19.9.1984, p. 1).

▼B

Apêndice

EXEMPLO DE UMA AVALIAÇÃO

Composto orgânico:	ácido 4-etoxibenzóico
Concentração teórica no ensaio:	600 mg/l
COD teórico:	390 mg/l
Inóculo:	estação de tratamento de águas residuais de
Concentração:	1 grama matéria seca/litro
Estado de adaptação:	não adaptado
Análise:	determinação do COD
Volume da amostra:	3 ml
Substância de controlo:	dietilenoglicol
Toxicidade do composto:	sem efeitos tóxicos para valores inferiores a 1 000 mg/l Ensaio realizado: ensaio em tubos de fermentação

Instante do ensaio	Substância de controlo				Substância de ensaio		
	Branco COD (1) mg/l	COD (1) mg/l	COD líquido mg/l	Degradação %	COD (1) mg/l	COD líquido mg/l	Degradação %
0	—	—	300,0	—	—	390,0	—
3 horas	4,0	298,0	294,0	2	371,6	367,6	6
1 dia	6,1	288,3	282,2	6	373,3	367,2	6
2 dias	5,0	281,2	276,2	8	360,0	355,0	9
5 dias	6,3	270,5	264,2	12	193,8	187,5	52
6 dias	7,4	253,3	245,9	18	143,9	136,5	65
7 dias	11,3	212,5	201,2	33	104,5	93,2	76
8 dias	7,8	142,5	134,7	55	58,9	51,1	87
9 dias	7,0	35,0	28,0	91	18,1	11,1	97
10 dias	18,0	37,0	19,0	94	20,0	2,0	99

(1) Valores médios de três determinações.

▼B

Figura 1

Exemplos de curvas de biodegradação

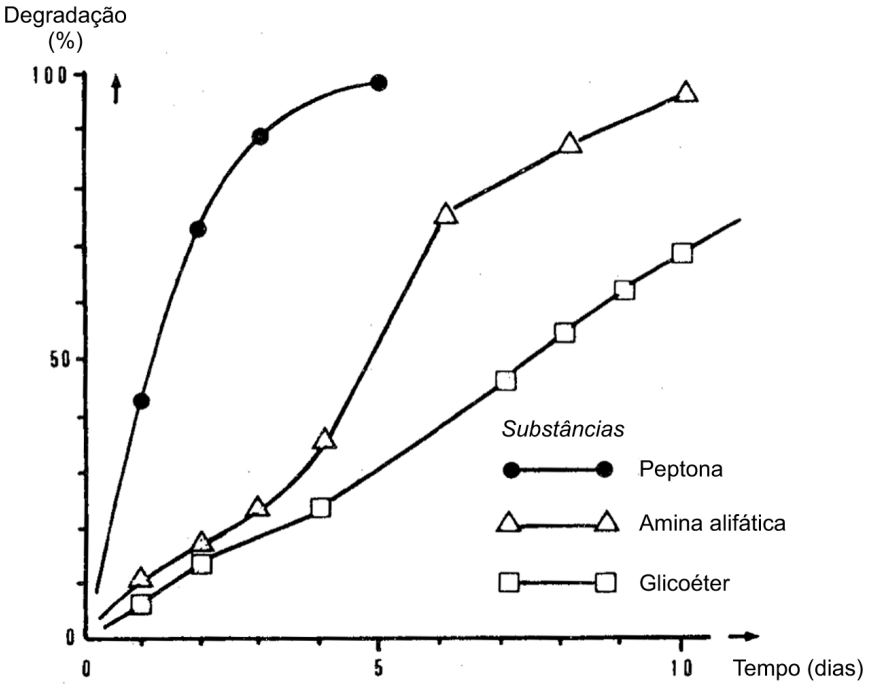
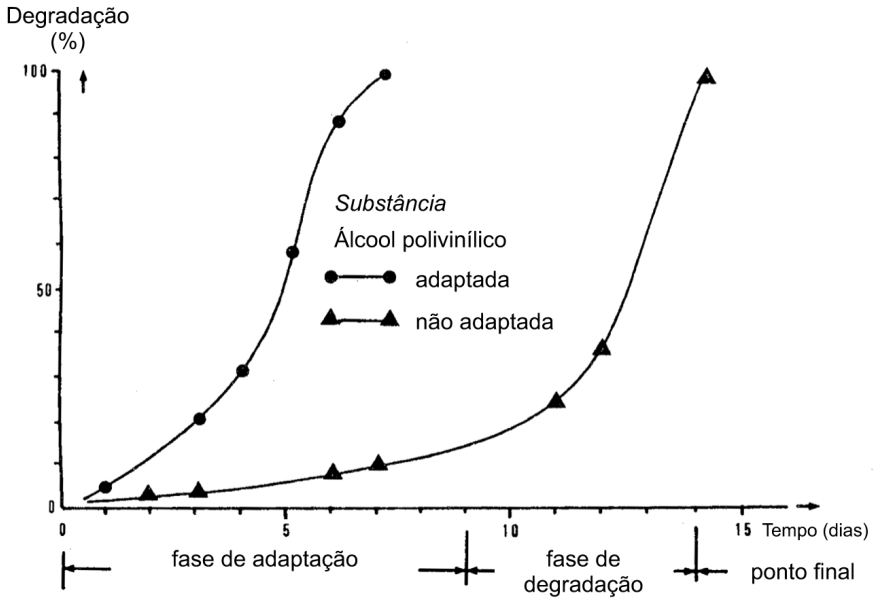


Figura 2

Exemplos de adaptação das lamas



▼M4

C.10. ENSAIO DE SIMULAÇÃO DO TRATAMENTO AERÓBIO DE EFLUENTES C.10-A: UNIDADES DE LAMAS ATIVADAS — C.10-B BIOFILMES

C.10-A: Unidades de lamas ativadas

INTRODUÇÃO

1. O presente método de ensaio é equivalente ao *Test Guideline* TG 303 da OCDE (2001). Na década de 1950, concluiu-se que os novos tensioativos causavam a formação excessiva de espuma nas estações de tratamento de águas residuais e nos cursos de água. Observou-se que não eram totalmente eliminados no tratamento aeróbio e que, em alguns casos, limitavam a remoção de outras matérias orgânicas. Este facto levou à realização de várias investigações sobre o modo como os tensioativos poderiam ser removidos das águas residuais e a compatibilidade dos novos produtos químicos produzidos pela indústria com o tratamento de águas residuais. Para este efeito, foram utilizados modelos de unidades que representavam os dois principais tipos de tratamento biológico aeróbio das águas residuais (lamas ativadas e filtração por percolação ou em leito percolador). Seria inviável e muito oneroso disseminar cada novo produto químico e monitorizar estações de tratamento em grande escala, mesmo a nível local.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Unidades de lamas ativadas

2. Estão descritos modelos de unidades de lamas ativadas de volume compreendido entre 300 ml e 2 000 ml. Alguns modelos, que constituem réplicas bastante fiéis de estações à escala real, possuem tanques de decantação a partir dos quais as lamas decantadas são bombeadas para um tanque de arejamento, enquanto outros, como o modelo Swisher (1), não possuem decantadores. As dimensões a adotar resultam de um compromisso; por um lado, devem ser suficientemente grandes para que as operações mecânicas sejam executadas de forma correta e para que o volume das amostras seja suficiente, sem afetar o funcionamento; por outro, o equipamento não deve ocupar demasiado espaço nem exigir uma quantidade excessiva de materiais.

3. As unidades de Husmann (2) e as unidades de vasos porosos (3)(4) constituem dois tipos de dispositivos utilizados em larga escala e de forma satisfatória, tendo sido os primeiros utilizados no estudo dos tensioativos; estas unidades são descritas no presente método de ensaio. Foram também utilizadas com resultados satisfatórios outras unidades, como, por exemplo, a de Eckenfelder (5). Atendendo ao custo relativamente elevado e ao esforço apreciável que o recurso ao presente ensaio de simulação implica, foram estudados em paralelo ensaios de rastreio mais simples e menos onerosos, que constam do capítulo C.4 A-F do presente anexo (6). A experiência adquirida com muitos tensioativos e outros produtos químicos demonstrou que aqueles que são aprovados nos ensaios de rastreio (facilmente biodegradáveis) se degradaram também no ensaio de simulação. Alguns produtos químicos que não foram aprovados nos ensaios de rastreio foram-no nos ensaios de biodegradabilidade inerente — capítulos C.12 (7) e C.19 (8), do presente anexo —, mas apenas alguns destes últimos se degradaram no ensaio de simulação; os produtos químicos não aprovados nos ensaios de biodegradabilidade inerente não se degradaram nos ensaios de simulação (9)(10)(11).

4. Para alguns fins, são suficientes os ensaios de simulação efetuados com uma única combinação condições experimentais; os resultados são expressos em percentagem de remoção do produto químico em estudo ou do carbono orgânico dissolvido (COD). O presente método apresenta uma descrição de um desses ensaios. No entanto, contrariamente à versão anterior deste capítulo, que descrevia apenas um tipo de dispositivo para o tratamento de águas residuais sintéticas em unidades interligadas, utilizando um método

▼M4

relativamente rudimentar de rejeição das lamas, o presente texto contempla diversas variantes. Descreve-se alternativas para o tipo de dispositivo, o modo de funcionamento, as águas residuais e a rejeição das lamas. O texto segue de perto a norma ISO 11733 (12), que foi objeto de análise cuidadosa durante a preparação deste método; porém, este não foi ainda sujeito a um ensaio interlaboratorial.

5. Para outros fins, é necessário conhecer de forma mais precisa a concentração do produto químico em estudo no efluente, o que implica o recurso a um método mais elaborado. O caudal da rejeição de lamas, por exemplo, deve ser controlado de forma mais precisa ao logo de cada dia e do período do ensaio, sendo necessário que as unidades funcionem com vários caudais de rejeição. No caso de um método mais elaborado, devem também ser realizados ensaios a duas ou três temperaturas diferentes: Birch (13)(14) descreve um método desse tipo, que se resume no apêndice 6. Contudo, os conhecimentos atuais são insuficientes para decidir quais os modelos cinéticos aplicáveis à biodegradação de produtos químicos no tratamento de águas residuais e no meio aquático em geral. A aplicação da cinética de Monod, que se refere no apêndice 6 a título de exemplo, limita-se a produtos químicos presentes em quantidades não inferiores 1 mg/l, embora, de acordo com algumas fontes, isto tenha ainda de ser demonstrado. O apêndice 7 diz respeito a ensaios a concentrações mais próximas das observadas nas águas residuais; contudo, esses ensaios, assim como os que constam do apêndice 6, não constituem, por si só, métodos diferenciados.

Filtros

6. Tem sido dada uma menor atenção aos modelos com filtros de percolação, provavelmente por ocuparem mais espaço e serem menos compactos do que os modelos de estações de lamas ativadas. Gerike *et al.* desenvolveram unidades de filtração em leito percolador e utilizaram-nas interligadas (15). Os filtros utilizados são relativamente grandes (altura 2 m; volume 60 l) e cada um deles necessita de um caudal de águas residuais da ordem de 2 l/h. Baumann *et al.* (16) simularam filtros de leito percolador inserindo fitas de poliéster "aveludado" em tubos de 1 m (14 mm de diâmetro interno) previamente imersas durante 30 minutos em lamas ativadas concentradas. O produto químico em estudo, única fonte de carbono numa solução de sais minerais, foi descarregado no tubo vertical e avaliou-se a biodegradação através de medições de COD no efluente e de CO_2 no gás libertado.

7. Foram simulados ainda biofiltros de outra forma (15): as superfícies internas de tubos rotativos, com uma inclinação ligeira em relação à horizontal, foram alimentadas com águas residuais (cerca de 250 ml/h) com e sem o produto químico em estudo, tendo os efluentes recolhidos sido analisados para a determinação do COD e/ou daquele produto.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

8. Este método destina-se a determinar a eliminação e a biodegradação primária e/ou final, por microrganismos aeróbios, de produtos químicos orgânicos hidrossolúveis, num sistema de ensaio em funcionamento contínuo que simula o processo das lamas ativadas. As fontes de carbono e de energia dos microrganismos são um meio orgânico facilmente biodegradável e o produto químico em estudo.

9. Duas unidades de ensaio em funcionamento contínuo (sistema de lamas ativadas ou de vasos porosos) funcionam em paralelo e em condições idênticas, selecionadas de acordo com o objetivo do ensaio. Normalmente, o tempo médio de retenção hidráulica é de 6 h e o tempo de permanência médio (tempo de retenção) das lamas é de 6 a 10 dias. A rejeição das lamas processa-se por um de dois métodos: o produto químico em estudo é geralmente adicionado ao afluente (meio orgânico) de apenas uma das unidades numa concentração compreendida entre 10 mg/l e 20 mg/l de carbono orgânico dissolvido (COD). A segunda unidade é utilizada como unidade de controlo para determinar a biodegradação do meio orgânico.

▼M4

10. Determina-se o COD (de preferência), ou a carência química de oxigénio (CQO), juntamente com a concentração do produto químico em estudo (se necessário), por meio de análises específicas efetuadas a amostras, colhidas com frequência, do efluente da unidade que recebe o produto químico em estudo. Presume-se que a diferença entre as concentrações de COD ou de CQO no efluente das unidades de ensaio e de controlo, é devida ao produto químico em estudo ou aos seus metabolitos orgânicos. Essa diferença é comparada com a concentração de COD ou CQO no afluente ao produto químico em estudo, a fim de determinar a eliminação deste.

11. A biodegradação pode geralmente distinguir-se da bioadsorção através de um exame cuidadoso da curva de eliminação em função do tempo, podendo confirmar-se através de um ensaio de biodegradabilidade "fácil", por recurso a um inóculo aclimatado da unidade recetora do produto químico em estudo.

INFORMAÇÃO SOBRE O PRODUTO QUÍMICO EM ESTUDO

12. A pureza, a hidrossolubilidade, a volatilidade e as características de adsorção do produto químico em estudo devem ser conhecidas, a fim de permitir uma interpretação correta dos resultados. Em geral, os produtos químicos voláteis e os produtos químicos insolúveis não podem ser alvo de ensaio, salvo se forem tomadas precauções especiais (ver o apêndice 5). A estrutura química ou, pelo menos, a fórmula empírica, devem também ser conhecidas para o cálculo dos valores teóricos e/ou a confirmação dos valores medidos de parâmetros como, por exemplo, a carência teórica de oxigénio (CTeO), o carbono orgânico dissolvido (COD) e a carência química de oxigénio (CQO).

13. O facto de se dispor de informações sobre a toxicidade do produto químico em estudo para os microrganismos (apêndice 4) pode ser útil para selecionar concentrações de ensaio adequadas e essencial para uma interpretação correta dos valores baixos de biodegradação que possam surgir.

NÍVEIS DE APROVAÇÃO

14. Na aplicação inicial do presente ensaio de simulação (confirmação) da biodegradação primária de tensioativos, era necessário que mais de 80 % do produto químico em causa fosse removido antes de o tensioativo poder ser comercializado. Se a referida percentagem não for atingida, pode recorrer-se ao presente ensaio de simulação (confirmação) e o tensioativo só pode ser comercializado se mais de 90 % do produto químico causa for removido. Com a maioria dos produtos químicos, não se coloca a questão da aprovação ou não aprovação e a percentagem de remoção obtida pode ser utilizada no cálculo aproximado da concentração ambiental provável a utilizar na avaliação dos perigos associados aos produtos químicos. Os resultados tendem a seguir um padrão "tudo ou nada". Numa série de estudos de produtos químicos puros, observou-se uma percentagem de remoção de COD superior a 90 % em mais de três quartos dos produtos químicos que revelaram um grau significativo de biodegradabilidade e superior a 80 % em mais de 90 % deles.

15. Às concentrações utilizadas no presente ensaio (cerca de 10 mg C/l), relativamente poucos produtos químicos (por exemplo, tensioativos) estão presentes nas águas residuais. Alguns produtos químicos podem ter efeitos inibidores a estas concentrações, ao passo que a cinética da remoção de outros pode apresentar diferenças a baixas concentrações. É possível efetuar uma avaliação mais precisa da degradação por recurso a métodos modificados, utilizando concentrações baixas realistas do produto químico em estudo; os dados obtidos podem ser utilizados para o cálculo das constantes cinéticas. No entanto, as técnicas experimentais necessárias ainda não foram totalmente validadas, nem foram estabelecidos os modelos cinéticos que descrevem as reações de biodegradação (ver o apêndice 7).

▼M4

SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

16. A fim de garantir uma execução correta do processo experimental, pode ser útil submeter a ensaio substâncias de comportamento conhecido, juntamente com os produtos químicos em estudo. Entre as primeiras contam-se o ácido adípico, o 2-fenilfenol, o 1-naftol, o ácido difénico, o ácido 1-naftóico, etc. (9)(10)(11).

REPRODUTIBILIDADE DOS RESULTADOS DOS ENSAIOS

17. Há muito menos referências de ensaios de simulação que de ensaios de determinação da biodegradabilidade "fácil". No caso dos produtos químicos com degradabilidade igual ou superior a 80 %, a reprodutibilidade entre ensaios simultâneos é boa (desvios de 10 a 15 %), embora a variabilidade aumente se o produto químico for menos degradável. Além disso, nas nove semanas em que decorreram os ensaios, alguns produtos químicos próximos do limite produziram resultados muito díspares (por exemplo, 10 % e 90 %) em diversas ocasiões.

18. Observou-se poucas diferenças nos resultados obtidos com os dois tipos de dispositivos, mas alguns produtos químicos exibiram uma degradação mais completa e constante na presença de águas residuais domésticas do que com o efluente sintético previsto no método da OCDE.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Dispositivos

Sistema de ensaio

19. O sistema de ensaio de um produto químico é constituído por uma unidade de ensaio e uma unidade de controlo; contudo, quando apenas se efetuam análises específicas (biodegradação primária), só é necessária uma unidade de ensaio. Pode ser utilizada uma unidade de controlo para várias unidades de ensaio que utilizem o mesmo produto químico em estudo ou produtos químicos diferentes. Em caso de interligação de unidades de ensaio (apêndice 3), cada unidade deve ter a sua própria unidade de controlo. O sistema de ensaio pode consistir num modelo de estação de lamas ativadas — unidade de Husmann (apêndice 1, figura 1) ou vaso poroso (apêndice 1, figura 2). Em ambos os casos, são necessários recipientes de armazenagem de dimensões adequadas aos afluentes e efluentes, bem como bombas para a adição do afluente, com ou sem uma solução do produto químico em estudo.

20. Cada unidade da instalação de lamas ativadas é constituída por um tanque de arejamento com uma determinada capacidade (cerca de três litros de lamas ativadas) e um separador (clarificador secundário) com capacidade de cerca de 1,5 litros; até certo ponto, os volumes podem ser alterados, mediante o ajustamento da altura do separador. São admissíveis recipientes de dimensões diferentes, desde que processam cargas hidráulicas comparáveis. Se não for possível manter a temperatura do local de ensaio no intervalo desejado, recomenda-se a utilização de recipientes com circulação de água a temperatura regulada. Utiliza-se uma bomba de ar ou uma bomba de dosagem para transferir as lamas ativadas do separador para o recipiente de arejamento, de forma contínua ou intermitente, a intervalos regulares.

21. O sistema de vasos porosos é composto por um cilindro poroso interno com fundo cónico, montado num recipiente ligeiramente maior de plástico impermeável, com a mesma forma. Um material adequado para o recipiente é polietileno poroso com poros de 90 μm de diâmetro máximo e 2 mm de espessura. A separação das lamas do meio orgânico tratado é efetuada por passagem diferencial através da parede porosa. Os efluentes são recolhidos no espaço anular, do qual transitam para o recipiente de recolha. Dado não ocorrer precipitação, não se regista retorno de lamas. O sistema, no seu conjunto, pode ser montado num banho-maria com controlo termostático.

▼M4

Os vasos porosos obstruem-se e podem transbordar nas fases iniciais. Nesse caso, substituir o revestimento poroso por um revestimento novo, extraindo, por bombagem, as lamas do recipiente para um balde limpo e removendo o revestimento. Após a limpeza do cilindro impermeável exterior, inserir um novo revestimento e retransferir as lamas no recipiente. As lamas aderentes às faces obstruídas do revestimento são também removidas cuidadosamente e transferidas. Começar por limpar os recipientes obstruídos, por meio de um jato fino de água, de forma a remover a lama remascente; enxaguar com uma solução diluída de hipoclorito de sódio e, seguidamente, com água, antes de proceder a uma lavagem completa com água.

22. Para o arejamento das lamas nos tanques de arejamento de ambos os sistemas podem utilizar-se métodos adequados, como, por exemplo, cubos sinterizados (rochas difusoras) e ar comprimido. Se necessário, o ar deve ser depurado, por passagem por um filtro adequado ou por lavagem. Deve circular pelo sistema uma quantidade de ar suficiente para manter as condições aeróbias e manter os flocos das lamas em suspensão permanente, durante o ensaio.

Dispositivo de filtração ou centrifugação

23. Dispositivo de filtração das amostras com filtros de membrana de porosidade adequada (diâmetro nominal da abertura: 0,45 μm), que adsorva substâncias orgânicas solúveis e liberte uma quantidade mínima de carbono orgânico. Caso se utilizem filtros que libertem carbono orgânico, lavá-los cuidadosamente com água quente, para eliminar o carbono orgânico lixiviável. Em alternativa, pode utilizar-se uma centrifugadora que produza 40 000 m/s^2.

Equipamento de análise

24. Aparelhos que permitam determinar os seguintes parâmetros:

— COD (carbono orgânico dissolvido) e COT (carbono orgânico total), ou CQO (carência química de oxigénio),

— substância específica, se necessário,

— sólidos em suspensão, pH, concentração de oxigénio na água,

— temperatura, acidez e alcalinidade,

— amónio, nitritos e nitratos, se o ensaio for executado em condições de nitrificação.

Água

25. Água da rede de abastecimento, com menos de 3 mg/l de COD. Determinar a alcalinidade, se não for conhecida.

26. Água desionizada, com menos de 2 mg/l de COD.

Meio orgânico

27. Podem utilizar-se como meio orgânico águas residuais sintéticas, águas residuais domésticas ou uma combinação de ambas. Foi demonstrado (11) (14) que a utilização de águas residuais domésticas simples origina com frequência uma maior percentagem de remoção de COD, permitindo mesmo a remoção e biodegradação de alguns produtos químicos que não sofrem biodegradação quando se utiliza o efluente sintético OCDE. Além disso, a adição permanente ou intermitente de águas residuais domésticas estabiliza frequentemente as lamas ativadas, melhorando a capacidade de precipitação, que constitui um parâmetro essencial. Recomenda-se, pois, a utilização de águas residuais domésticas. Determinar a concentração de COD (ou a CQO) de cada novo lote de meio orgânico. Deve conhecer-se a acidez ou a alcalinidade do meio orgânico. Se esta acidez ou alcalinidade for baixa, pode ser necessário adicionar ao meio um tampão adequado (hidrogenocarbonato de sódio ou di-hidrogenofosfato de potássio), para manter o pH no tanque de arejamento a cerca de 7,5 ± 0,5, durante o ensaio. A quantidade de solução-tampão e o momento em que é adicionada devem ser decididos caso a caso. Quando as misturas são utilizadas de forma contínua ou intermitente, o seu teor de COD, ou a CQO, devem ser mantidos a um valor aproximadamente constante, por exemplo, diluindo com água.

▼M4

Águas residuais sintéticas

28. Dissolver, por cada litro de água da rede de abastecimento, 160 mg de peptona; 110 mg de extrato de carne; 30 mg de ureia; 28 mg de hidrogenofosfato dipotássico anidro (K_2HPO_4); 7 mg de cloreto de sódio (NaCl); 4 mg de cloreto de cálcio di-hidratado ($CaCl_2.2H_2O$); 2 mg de sulfato de magnésio hepta-hidratado ($Mg_2SO_4.7H_2O$). O efluente sintético OCDE constitui um exemplo e proporciona uma concentração média de COD no afluente de cerca de 100 mg/l. Em alternativa, podem utilizar-se composições mais próximas das das águas residuais em estudo, com uma concentração idêntica de COD. Se for necessário um afluente menos concentrado, diluir o efluente sintético, por exemplo, na proporção 1:1, com água da rede de abastecimento, de forma a obter uma concentração da ordem de 50 mg/l. O recurso a uma concentração mais baixa permitirá uma melhor proliferação dos organismos nitrificantes, pelo que esta modificação é aconselhável caso o estudo diga respeito à simulação de estações de tratamento de águas residuais com nitrificação. O efluente sintético, numa forma concentrada, pode ter por base água destilada e ser armazenado a cerca de 1 °C durante uma semana, no máximo. Se necessário, diluir com água da rede de abastecimento (este meio não é inteiramente satisfatório, uma vez que, por exemplo, a concentração de azoto é muito elevada e o teor de carbono relativamente baixo, mas não foram sugeridas alternativas melhores, exceto a adição de mais fosfato no tampão e de uma quantidade suplementar de peptona).

Águas residuais domésticas

29. Utilizar águas residuais recentemente decantadas, recolhidas diariamente numa instalação de tratamento que processe predominantemente esgotos domésticos. A amostra deve ser recolhida, antes de decantação primária, da conduta de alimentação do decantador, ou da conduta de alimentação da instalação de lamas ativadas, e ter a menor quantidade possível de partículas grosseiras. As águas residuais podem ser utilizadas após terem sido armazenadas durante vários dias (em geral, não mais de sete), a cerca de 4 °C, caso se apresentem provas de que o COD (ou a CQO) não baixou significativamente (ou seja, mais de 20 %) durante a armazenagem. A fim de evitar perturbações do sistema, o COD (ou a CQO) de cada novo lote deve ser ajustado, antes da utilização, para um valor constante, por exemplo, através de diluição com água da rede de abastecimento.

Lamas ativadas

30. As lamas ativadas para inoculação devem ser recolhidas num tanque de arejamento de uma estação de tratamento de águas residuais explorada corretamente ou numa unidade de lamas ativadas à escala laboratorial, que trate predominantemente águas residuais domésticas.

Soluções-mãe da substância em estudo

31. No caso de produtos químicos com solubilidade adequada, preparar soluções-mãe de reserva de concentrações apropriadas (por exemplo, 1 a 5 g/l) em água desionizada, ou na fração mineral do efluente sintético (no caso de produtos químicos insolúveis e voláteis, ver o apêndice 5). Determinar o COD e o carbono orgânico total (COT) da solução-mãe e repetir as medições para cada novo lote. Se a diferença entre o COD e o COT for superior a 20 %, verificar a solubilidade em água do produto químico em estudo. Comparar o COD ou a concentração do produto químico em estudo determinados por análise específica da solução-mãe com o valor nominal, de forma a averiguar se a recuperação é suficiente (em geral, deve ser superior a 90 %). Verificar, em especial no caso das dispersões, se o COD pode ou não ser utilizado como parâmetro analítico, ou se é necessário utilizar uma técnica analítica específica para o produto químico em causa. Com as dispersões, é necessário proceder à centrifugação das amostras. Para cada novo lote, determinar o COD, a CQO ou o produto químico em estudo por meio de uma análise específica.

▼M4

32. Determinar o pH da solução-mãe. A ocorrência de valores extremos indica que a adição do produto químico pode influenciar o pH das lamas ativadas no sistema de ensaio. Neste caso, neutralizar a solução de reserva com pequenas quantidades de ácido ou de base, de forma a obter um pH de 7,0 ± 0,5, evitando, contudo, a precipitação do produto químico em estudo.

PROCEDIMENTO

33. O procedimento descrito é aplicável a unidades de instalações de lamas ativadas; no caso de um sistema de vasos porosos, tem de sofrer adaptações ligeiras.

Preparação do inóculo

34. No início do ensaio, inocular o sistema com lamas ativadas ou com um inóculo com baixa concentração de microrganismos. Manter o inóculo arejado à temperatura ambiente, até ser utilizado (em menos de 24 horas). No primeiro caso, colher uma amostra de lama ativada do tanque de arejamento de uma estação de tratamento de águas residuais biológica que funcione de forma eficiente, ou de uma estação de tratamento à escala laboratorial, que processe essencialmente efluentes domésticos. Se for necessário simular condições de nitrificação, utilizar lamas provenientes de uma estação de tratamento de águas residuais com nitrificação. Determinar a concentração de sólidos em suspensão e, se necessário, concentrar as lamas por sedimentação, de forma a que o volume adicionado ao sistema de ensaio seja mínimo. Assegurar uma concentração inicial de matéria seca da ordem de 2,5 g/l.

35. No segundo caso, utilizar como inóculo 2 a 10 ml/l de efluente proveniente de uma estação de tratamento de águas residuais domésticas biológica. Para dispor do maior número possível de diferentes espécies de bactérias, pode ser útil adicionar inóculos provenientes de várias fontes, como, por exemplo, águas de superfície. Neste caso, as lamas ativadas desenvolver-se-ão e proliferarão no sistema de ensaio.

Introdução de meio orgânico

36. Assegurar que os recipientes do afluente e do efluente, bem como a conduta entre o primeiro e o segundo, são bem limpos, de forma a eliminar qualquer proliferação de flora microbiana antes do ensaio e durante o mesmo. Montar os sistemas de ensaio num compartimento com controlo de temperatura (em geral, na gama 20-25 °C) ou utilizar unidades com circulação de água. Preparar um volume suficiente de meio orgânico (pontos 27 e 29). Começar por encher o tanque de arejamento e o separador com o meio orgânico, adicionando em seguida o inóculo (pontos 34, 35). Iniciar o arejamento de modo a manter as lamas em suspensão, em condições aeróbias, e começar a introdução do afluente e a reciclagem das lamas decantadas. Transferir o meio orgânico dos tanques de armazenagem para os recipientes de arejamento (pontos 20 e 21) das unidades de ensaio e de controlo, e recolher os respetivos efluentes em tanques de armazenagem idênticos. Para obter o tempo de retenção hidráulica normal (6 h), o meio orgânico é bombeado a 0,5 l/h. Para confirmar este caudal, medir a quantidade diária de meio orgânico adicionado, registando o decréscimo dos volumes do meio nos recipientes de armazenagem. Para determinar os efeitos das descargas intermitentes e descargas intensivas de produtos químicos, seriam necessárias outras formas de dosagem.

37. Se o meio orgânico for preparado para utilização por um período superior a um dia, é necessário arrefecê-lo a cerca de 4 °C, ou recorrer a outros métodos adequados de conservação, para evitar a proliferação de microrganismos e a ocorrência de biodegradação fora das unidades de ensaio (ponto 29). Se for utilizado efluente sintético, pode preparar-se, e armazenar-se a cerca de 4 °C, uma solução-mãe concentrada (por exemplo, com uma concentração 10 vezes superior à normal - ponto 28). Esta solução pode ser diluída com um volume adequado de água da rede de abastecimento, antes da utilização. Em alternativa, pode ser bombeada diretamente, sendo o referido volume adequado de água da rede de abastecimento bombeado separadamente.

▼M4

Introdução do produto químico em estudo

38. Adicionar um volume adequado da solução-mãe do produto químico em estudo (ponto 31) ao recipiente de armazenagem de efluente ou introduzi-la diretamente, com uma bomba, no tanque de arejamento. A concentração média normal do produto químico em estudo no afluente deve estar compreendida entre 10 mg/l e 20 mg/l de COD, não devendo exceder 50 mg/l. Se a solubilidade em água do produto químico for baixa, ou se for provável a ocorrência de efeitos tóxicos, reduzir a concentração para 5 mg/l de COD ou menos, mas apenas se estiver disponível e puder ser aplicado um método analítico específico (os produtos químicos dispersos que forem pouco solúveis em água podem ser adicionadas por recurso a técnicas especiais de dosagem — ver o apêndice 5).

39. Começar a adcionar o produto químico em estudo após um período necessário à estabilização do sistema e à eliminação eficiente (cerca de 80 %) do COD do meio orgânico. Antes da adição do produto químico, é importante verificar se todas as unidades estão a funcionar de forma igualmente eficaz; se tal não for o caso, justifica-se, geralmente, misturar as lamas e redistribuir volumes iguais pelas unidades. Quando se utiliza um inóculo de cerca de 2,5 g/l (massa a seco) de lama ativada, o produto químico em estudo pode ser adicionado no início do ensaio, uma vez que a adição direta de quantidades crescentes desde o início apresenta a vantagem de as lamas ativadas poderem adaptar-se melhor à substância. Independentemente do método de adição, recomenda-se que o caudal e/ou os volumes no(s) recipiente(s) de armazenagem sejam medidos com intervalos regulares.

Processamento das lamas ativadas

40. Durante o ensaio, independentemente do inóculo utilizado, a concentração das lamas ativadas sólidas estabiliza-se, em geral, entre determinados limites, no intervalo de 1 a 3 g/l (massa a seco), em função da natureza e da concentração do meio orgânico, das condições de funcionamento, da natureza dos microrganismos presentes e da influência do produto químico em estudo.

41. Determinar os sólidos em suspensão nos tanques de arejamento, pelo menos, uma vez por semana e eliminar o excesso de lamas, de forma a manter a concentração na gama 1 g/l a 3 g/l (massa a seco), ou manter constante o tempo de permanência médio das lamas (em geral, na gama de 6 a 10 dias). Se, por exemplo, for escolhido um tempo de retenção das lamas de oito dias, remover diariamente e eliminar 1/8 do volume das lamas ativadas contidas no tanque de arejamento. Efetuar esta operação diariamente ou, de preferência, recorrer a um dispositivo automático de bombagem intermitente. O facto de manter a concentração de sólidos em suspensão a níveis constantes, ou dentro de limites restritos, não permite obter um valor constante do tempo de retenção das lamas, parâmetro que condiciona a concentração do produto químico em estudo no efluente.

42. Durante todo o ensaio, remover, pelo menos uma vez por dia, as lamas aderentes às paredes do tanque de arejamento e do separador, de forma a repô-las em suspensão. Verificar e limpar regularmente todas as tubagens, para impedir a formação de biofilmes. Transferir a lama decantada do separador para o tanque de arejamento, de preferência por bombagem intermitente. Embora não ocorra reciclagem no sistema de vasos porosos, importa assegurar que são inseridos vasos interiores limpos antes de o volume no tanque aumentar significativamente (ponto 21).

43. Nas unidades de Husmann, pode observar-se precipitação deficiente e perda de lamas. Estas ocorrências podem ser retificadas através de um dos procedimentos que se referem de seguida, aplicados em paralelo nas unidades de ensaio e de controlo:

— podem adicionar-se a intervalos regulares (por exemplo, semanalmente) lamas frescas ou floculante (por exemplo, 2 ml de solução de 50 g/l $FeCl_3$ por tanque), verificando, porém, que não ocorre qualquer reação nem precipitação do produto químico em estudo com $FeCl_3$,

▼M4

— á bomba de ar pode ser substituída por uma bomba peristáltica que proprocione um caudal de recirculação das lamas aproximadamente igual ao caudal do afluente e o desenvolvimento de uma zona anaeróbia nas lamas decantadas (a geometria da bomba de ar limita o caudal mínimo das lamas de retorno a cerca de doze vezes o caudal do afluente),

— as lamas podem ser bombeadas por intermitência do separador do tanque de arejamento (por exemplo, 5 minutos em cada 2,5 h, para reciclar de 1 a 1,5 l/h),

— pode utilizar-se um agente antiespumante não tóxico (por exemplo, óleo de silicone), numa concentração mínima, para evitar as perdas através das espumas,

— pode-se fazer borbulhar ar nas lamas do separador, em rajadas curtas (por exemplo, 10 segundos por hora),

— o meio orgânico pode ser introduzido no tanque de arejamento a intervalos regulares (por exemplo, 3 a 10 minutos por hora).

Amostragem e análise

44. Medir, a intervalos regulares, a concentração de oxigénio dissolvido, a temperatura e o pH das lamas ativadas, nos tanques de arejamento. Garantir que esteja sempre presente oxigénio em quantidade suficiente (> 2 mg/l) e a temperatura seja mantida na gama pretendida (em geral, de 20 °C a 25 °C). Manter o pH a 7,5 ± 0,5, por adição de pequenas quantidades de base ou ácido inorgânicos no tanque de arejamento ou no afluente, ou aumentando a capacidade-tampão do meio orgânico (ver ponto 27). A nitrificação produz ácido; a oxidação de 1 mg de azoto produz o equivalente de cerca de 7 mg de CO_3^{2-}. A frequência das medições depende do parâmetro a medir e da estabilidade do sistema, podendo variar consoante as medições sejam diárias ou semanais.

45. Medir o COD ou a CQO nos afluentes dos tanques de ensaio e de controlo. Medir a concentração do produto químico em estudo no afluente respetivo, através de uma análise específica ou por estimativa, com base na sua concentração na solução-mãe (ponto 31), no volume utilizado e na quantidade de águas residuais tratadas na unidade de ensaio. Recomenda-se o cálculo da concentração do produto químico em estudo, a fim de reduzir a variabilidade dos valores obtidos para a concentração.

46. Recolher amostras adequadas nos efluentes (por exemplo, amostras compósitas em 24 h), e filtrar com uma membrana de porosidade 0,45 μm, ou centrifugar a cerca de 40 000 m/s^2 durante 15 minutos. Deve recorrer-se à centrifugação se a filtragem for difícil. Determinar o COD ou a CQO pelo menos em duplicado, para avaliar a biodegradação final e, se necessário, a biodegradação primária, através de uma análise específica do produto químico em estudo.

47. A baixas concentrações, a utilização da CQO pode originar problemas analíticos, pelo que se recomenda apenas para concentrações suficientemente elevadas do produto químico em estudo (cerca de 30 mg/l). Além disso, no caso de produtos químicos fortemente adsorventes, recomenda-se a determinação da quantidade de produto químico em estudo adsorvida nas lamas, por recurso a uma técnica analítica específica.

48. A frequência de amostragem depende da duração prevista do ensaio. Recomenda-se uma frequência de três vezes por semana. Se as unidades estiverem a funcionar eficazmente, prever um período de adaptação de uma semana a, no máximo, seis semanas após a adição do produto químico em estudo, para que seja atingido um estado estacionário. Para a avaliação do resultado do ensaio, obter, de preferência, um mínimo de 15 valores válidos na fase de patamar (ponto 59), que dura, em geral, três semanas. O ensaio pode ser concluído se for observado um grau de eliminação suficiente (por exemplo, superior a 90 %) e se estiverem disponíveis os 15 valores referidos, representativos de análises efetuadas todos os dias durante três semanas. A duração do ensaio não deve, em geral, exceder 12 semanas após a adição do produto químico em estudo.

▼M4

49. Se as lamas nitrificarem e se pretender estudar os efeitos do produto químico em estudo na nitrificação, determinar o amónio e/ou os nitritos, bem como os nitratos, em amostras dos efluentes das unidades de ensaio e de controlo, pelo menos uma vez por semana.

50. Todas as análises (em especial as determinações de azoto) devem ser efetuadas tão rapidamente quanto possível. Se for necessário adiar a realização das análises, armazenar as amostras a cerca de 4 °C, na obscuridade, em garrafas hermeticamente fechadas. Se for necessário armazenar as amostras por um período superior a 48 horas, conservá-las por ultracongelação, acidificação (por exemplo, com 10 ml/l de solução de ácido sulfúrico a 400 g/l) ou por adição de uma substância tóxica adequada (por exemplo, 20 ml/l de uma solução de cloreto de mercúrio (II) a 10 g/l). Assegurar que a técnica de conservação não influencia os resultados da análise.

Interligação das unidades de ensaio

51. Caso se recorra a uma interligação (apêndice 3), efetuar diariamente trocas da mesma quantidade de lamas ativadas (150 ml a 1 500 ml, no caso de tanques de arejamento que contenham 3 litros de fase líquida) entre os tanques de arejamento da unidade de ensaio e da unidade de controlo. Se o produto químico em estudo for fortemente adsorvido pelas lamas, alterar apenas o sobrenadante dos separadores. Em ambos os casos, utilizar um fator de correção para calcular os resultados dos ensaios (ponto 55).

DADOS E RELATÓRIOS

Tratamento dos resultados

52. Calcular a percentagem de eliminação do produto químico em estudo, em termos de COD ou de CQO, para cada avaliação programada, por recurso à equação:

$$D_t = \frac{C_s - (E - E_o)}{C_s} \times 100$$

em que

D_t = % de eliminação do COD ou da CQO no instante *t*

C_s = COD ou CQO no afluente devidos ao produto químico em estudo, estimado, de preferência, a partir da solução-mãe (mg/l)

E = valor medido de COD ou CQO no efluente em estudo, no instante *t* (mg/l)

E_o = valor medido de COD ou CQO no efluente de controlo, no instante *t* (mg/l)

53. O grau de eliminação de COD ou de CQO do meio orgânico da unidade de controlo é uma informação útil para avaliar a atividade de biodegradação das lamas ativadas, durante o ensaio. Calcular a percentagem de eliminação por recurso à equação:

$$D_B = \frac{C_M - E_o}{C_M} \times 100$$

em que

D_B = % de eliminação do COD ou da CQO do meio orgânico na unidade de controlo, no instante *t*

C_M = COD ou de CQO do meio orgânico no afluente de controlo (mg/l)

▼M4

Como opção, calcular a percentagem de eliminação do COD ou da CQO devida ao meio orgânico e ao produto químico em estudo na unidade de ensaio, com base na seguinte equação:

$$D_T = \frac{C_T - E}{C_T} \times 100$$

em que

D_T = % de eliminação do COD ou da CQO total do afluente em estudo

C_T = COD ou CQO total do afluente em estudo, ou calculados a partir das soluções-mãe (mg/l)

54. Calcular a remoção do produto químico em estudo, se determinada por um método analítico específico, em cada instante, com base na equação:

$$D_{ST} = \frac{S_i - S_e}{S_i} \times 100$$

em que

D_{ST} = % de eliminação primária do produto químico em estudo, no instante *t*

S_i = concentração medida ou estimada do produto químico em estudo no afluente (mg/l)

S_e = concentração medida ou estimada do produto químico em estudo no efluente, no instante *t* (mg/l)

55. Caso tenha sido utilizado o modo de interligação, compensar, através de um fator de correção, a diluição do produto químico em estudo no tanque de arejamento devida à substituição das lamas (ver o apêndice 3). Se tiver sido utilizado um tempo de retenção hidráulica médio de 6 h e se tiver procedido à substituição de metade do volume de lamas ativadas contido no tanque de arejamento, é necessário corrigir os valores de eliminação diária determinados (D_t, ponto 52), de forma a obter o verdadeiro grau de eliminação, D_{tc}, do produto químico em estudo, através da seguinte equação:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

Apresentação dos resultados do ensaio

56. Traçar o gráfico da percentagem de remoção, D_t (ou D_{tc}) e D_{st}, consoante o caso, em função do tempo (ver o apêndice 2). A forma da curva de remoção do produto químico em estudo (em relação ao próprio produto ou na forma de COD) permite tirar algumas conclusões sobre o processo de remoção.

Adsorção

57. Caso se observe uma elevada remoção de COD do produto químico em estudo desde o início do ensaio, o produto em causa é, provavelmente, removido por adsorção nos sólidos das lamas ativadas. É possível comprovar este fenómeno através da determinação da quantidade de produto químico em estudo adsorvido, por recurso a um método de análise específico. Não é habitual que a eliminação do COD de produtos químicos adsorvíveis se mantenha a um nível elevado durante todo o ensaio; em geral, observa-se um elevado grau de eliminação no início, que baixa progressivamente para um valor de equilíbrio. Contudo, se o produto químico adsorvível em estudo tiver causado, de qualquer forma, a aclimatação da flora microbiana, a remoção do seu COD poderá aumentar posteriormente, estabilizando-se em valores elevados.

▼M4

Fase de latência

58. Muitos produtos químicos em estudo passam por uma fase de latência, antes de ocorrer a biodegradação completa, nomeadamente nos ensaios estáticos de rastreio. Na fase de latência, ocorre a aclimatação ou adaptação das bactérias responsáveis pela degradação, não se observando praticamente qualquer eliminação do produto químico em estudo; a proliferação das bactérias inicia-se em seguida. Esta fase termina, iniciando-se a fase de degradação, quando for eliminada cerca de 10 % da quantidade inicial de produto químico em estudo (após a adsorção, caso ocorra). Em geral, a fase de latência é muito variável e pouco reprodutível.

Fase de patamar

59. A fase de patamar da curva de eliminação de um ensaio contínuo é definida como a fase em que ocorre a degradação máxima. Deve durar, pelo menos, três semanas, durante as quais importa determinar cerca de 15 valores válidos.

Grau de eliminação médio do produto químico em estudo

60. Calcular o valor médio a partir dos valores de eliminação (D_t) obtidos para o produto químico em estudo na fase de patamar. O grau de eliminação do produto químico em estudo é arredondado ao número inteiro mais próximo (1 %). Recomenda-se também o cálculo do intervalo de confiança de 95 % do valor médio.

Eliminação do meio orgânico

61. Desenhar o gráfico da percentagem de eliminação do COD ou da CQO do meio orgânico na unidade de controlo (D_B) em função do tempo. Indicar o grau de eliminação médio da mesma forma que para o produto químico em estudo (ponto 60).

Indicação da biodegradação

62. Se o produto químico em estudo não for adsorvido de forma significativa pelas lamas ativadas e a curva de eliminação tiver a forma característica de uma curva de biodegradação com fases de latência, degradação e patamar (pontos 58 e 59), a remoção determinada pode ser atribuída com confiança à biodegradação. Se ocorrer uma elevada remoção inicial, o ensaio de simulação não permite distinguir os processos de eliminação biológicos dos abióticos. Nesses casos, e noutros em que existam dúvidas quanto a biodegradação (por exemplo, se ocorrer separação), analisar o produto químico em estudo adsorvido ou efetuar mais ensaios estáticos de biodegradação com base em parâmetros que comprovem claramente os processos biológicos. Trata-se, designadamente, dos métodos baseados no consumo de oxigénio [capítulo C.4, D, E e F do presente anexo (6)], de um ensaio com medição do dióxido de carbono produzido [capítulo C.4 C do presente anexo (6)] ou do método de *headspace* da ISO (18), utilizando um inóculo pré-exposto do ensaio de simulação. Se tiverem sido determinadas a remoção do COD e a eliminação das substâncias específicas, a ocorrência de diferenças significativas entre as percentagens (primeiro valor superior ao segundo) indicam a presença nos efluentes de substâncias orgânicas intermediárias cuja degradação pode ser mais difícil que a da substância de origem.

Validade dos resultados

63. Obtêm-se informações sobre o comportamento do inóculo em matéria de biodegradação se for determinado o grau de eliminação do meio orgânico (ponto 53) da unidade de controlo. Considerar o ensaio válido se, decorridas duas semanas, o grau de eliminação do COD ou da CQO da(s) unidade(s) de controlo exceder 80 % e não se registarem quaisquer ocorrências relevantes.

▼M4

64. Se tiver sido utilizada uma substância de referência facilmente biodegradável, o grau de biodegradação (D_T, ponto 52) deve ser superior a 90 %.

65. Se o ensaio for efetuado em condições de nitrificação, a concentração média nos efluentes devem ser inferior a 1 mg/l de azoto amoniacal e a 2 mg/l de azoto na forma de nitritos.

66. Se esses critérios (pontos 63-65) não forem cumpridos, repetir o ensaio utilizando um inóculo de origem diferente, submeter a ensaio uma substância de referência e rever todos os procedimentos experimentais.

Relatório do ensaio

67. O relatório do ensaio deve incluir as seguintes informações:

Produto químico em estudo:

— dados de identificação,

— natureza física e, quando pertinente, propriedades físico-químicas.

Condições de ensaio:

— tipo de sistema de ensaio; quaisquer alterações introduzidas para o ensaio de produtos químicos insolúveis e voláteis,

— tipo de meio orgânico,

— proporção e natureza das águas residuais provenientes de indústrias, se conhecidas,

— inóculo: natureza e local(is) de amostragem, concentração e eventual pré-tratamento,

— solução-mãe do produto químico em estudo: teor de COD e COT; forma de preparação, caso se trate de uma suspensão; concentração de ensaio utilizada; fundamentação de um eventual afastamento da gama de 10 a 20 mg/l de COD; método de adição; data da primeira adição; quaisquer alterações,

— tempo de permanência médio das lamas e tempo médio de retenção hidráulica; método de remoção das lamas; métodos para evitar a mistura e a perda de lamas, etc.,

— técnicas de análise utilizadas,

— temperatura de ensaio,

— qualidades das lamas misturadas, índice de volume das lamas, mistura de sólidos em suspensão no meio fluido,

— eventuais desvios aos procedimentos normalizados e quaisquer ocorrências que possam ter afetado os resultados.

Resultados do ensaio:

— todos os valores medidos (COD, CQO, análises específicas, pH, temperatura, concentração de oxigénio, sólidos em suspensão, substâncias azotadas, se for caso disso,

— todos os valores calculados dos parâmetros D_t (ou D_{tc}), D_B, D_{St}, na forma de quadro e a partir das curvas de eliminação,

— informações sobre as fases de latência e de patamar, a duração do ensaio, o grau de eliminação do produto químico em estudo e do meio orgânico na unidade de controlo, juntamente com dados estatísticos e conclusões sobre a biodegradabilidade e a validade do ensaio,

— discussão dos resultados.

▼**M4**

REFERÊNCIAS:

(1) Swisher RD (1987). "Surfactant Biodegradation", 2nd Edn. Marcel Dekker Inc. New York, 1085 pp.

(2) Governo alemão (1962): Verordnung über die Abbaubarkeit von Detergentien in Wasch- un Reinigungsmitteln. *Bundesgesetzblatt*, Pt.1 No.49: 698--706.

(3) Painter H.A., King E.F. (1978a). WRc porous-pot method for assessing biodegradability. Technical Report No.70, Water Research Centre, Medmenham, Reino Unido.

(4) Painter H.A., King E.F. (1978b). The effect of phosphate and temperature on growth of activated sludge and on biodegradation of surfactants. *Wat. Res*. 12: 909-915.

(5) Eckenfelder, W.W (19) US EPA.

(6) Capítulo C.4 deste anexo: "Determinação da biodegradabilidade "fácil"".

(7) Capítulo C.12 deste anexo: "Biodegradação - Ensaio L.A.S.C. modificado".

(8) Capítulo C.19 deste anexo: "Estimativa do valor do coeficiente de adsorção (K_{OC}) em solos e em lamas de depuração por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)".

(9) Gerike P., Fischer W.K. (1979): A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests. *Ecotox. Env. Saf*. 3:157-173.

(10) Gerike P., Fischer W.K. (1981), como (9), II Additional results and conclusions. *Ecotox. Env. Saf*. 5: 45-55.

(11) Painter H.A., Bealing D, (1989): Experience and data from the OECD activated sludge simulation test. pp 113-138, In: Laboratory tests for simulation of water treatment processes. CEC Water Pollution Report 18. Eds. Jacobsen B.N., Muntau H., Angeletti G.

(12) ISO 11733 (1995; revista em 2004). Evaluation of the elimination and biodegradability of organic substances in an aqueous medium - activated sludge simulation test.

(13) Birch R.R. (1982). The biodegradability of alcohol ethoxylates. XIII Jornado Com. Español. Deterg.: 33-48.

(14) Birch R.R. (1984). Biodegradation of noniomic surfactants. J.A.O.C.S. 61 (2): 340-343.

(15) Gerike P., Fischer W.K., Holtmann W. (1980): Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD confirmatory test. *Wat.Res*. 14: 753-758.

(16) Baumann U., Kuhn G., Benz M. (1998): Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, UWSF — *Z. Umweltchem. Ökotox*. 10: 214-220.

(17) Her Majesty's Stationery Office (1982). Assessment of biodegradability. Methods for the examination of waters and associated materials. p. 91-98 ISBN 011 751661 9.

(18) ISO 14593 (1998). Water Quality — Evaluation in an aqueous medium of the ultimate biodegradability of organic compounds. Method by the analysis of inorganic carbon in sealed vessels.

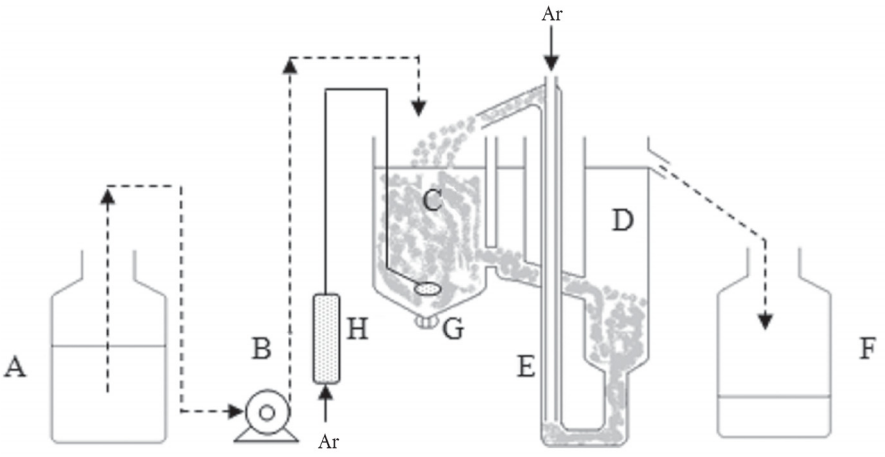
▼**M4**

Apêndice 1

Figura 1

Equipamentos utilizados para avaliar a biodegradação

Unidade de Husmann



A. Tanque de armazenagem

B. Bomba doseadora

C. Câmara de arejamento (capacidade 3 l)

D. Tanque de decantação

E. Bomba de ar comprimido

F. Tanque de recolha

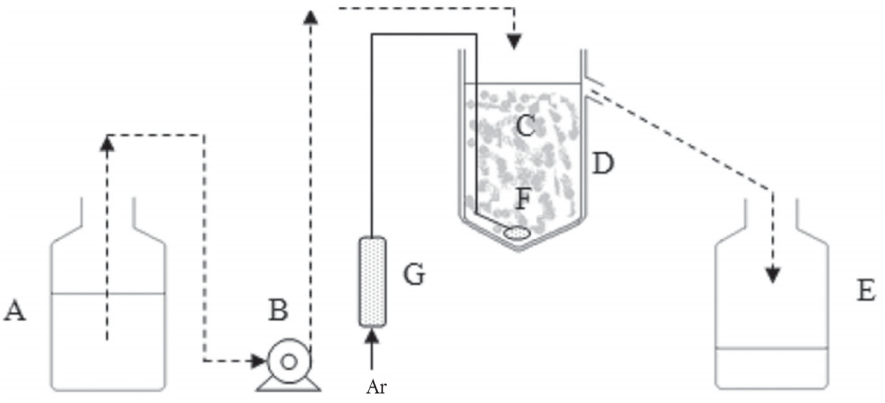
G. Arejador

H. Medidor do caudal de ar

Figura 2

Equipamentos utilizados para avaliar a biodegradação

Vaso poroso



A. Tanque de armazenagem

B. Bomba de dosagem

C. Tanque poroso de arejamento

D. Recipiente exterior impermeável

E. Tanque de recolha

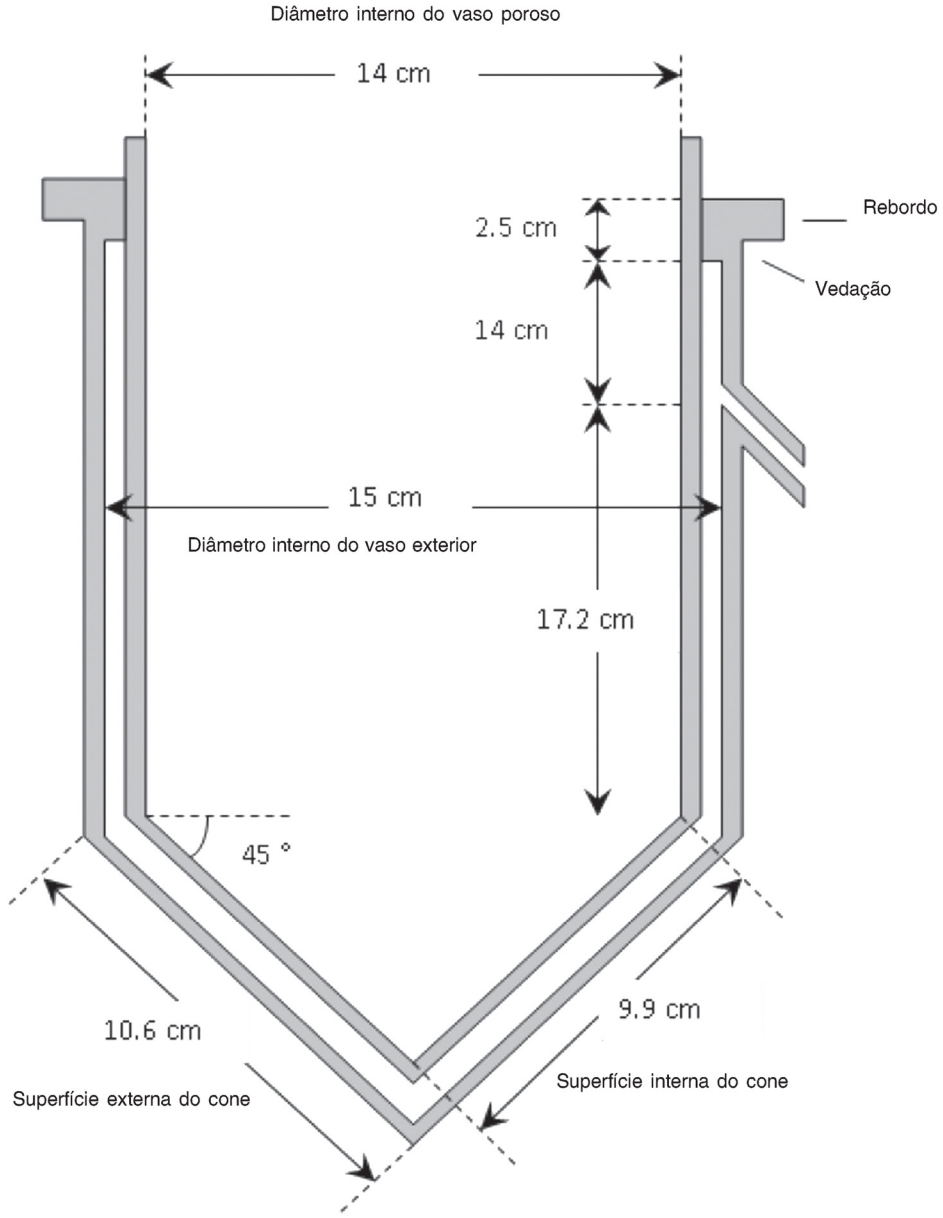
F. Difusor

G. Caudalímetro de ar

▼M4

Figura 3

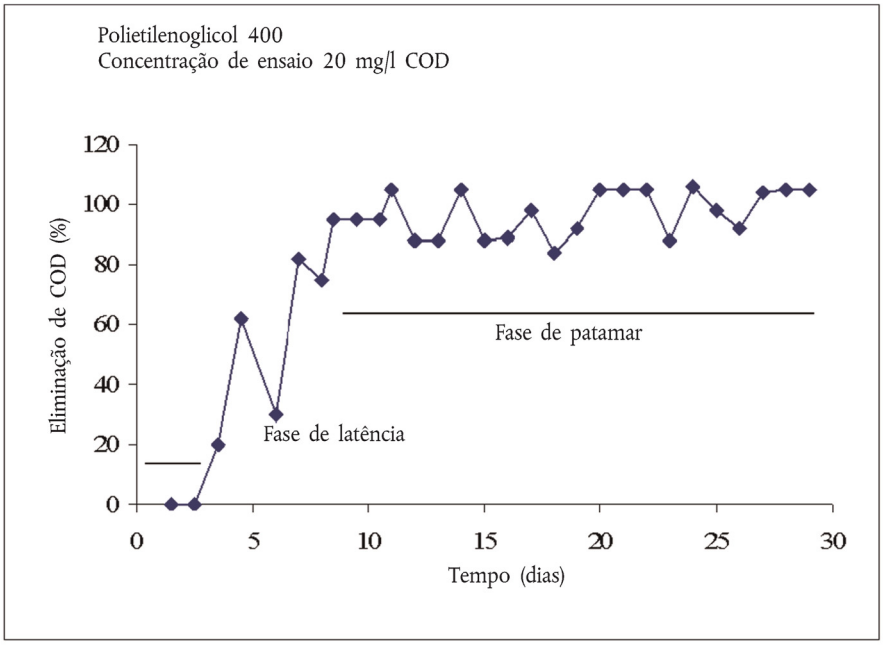
Pormenor do vaso poroso de arejamento de três litros



▼**M4**

Apêndice 2

Exemplo de curva de eliminação



▼M4

Apêndice 3

[INFORMATIVO]

INTERLIGAÇÃO DAS UNIDADES DE ENSAIO

Para tentar igualizar as populações microbianas nas lamas de uma unidade de ensaio que processa águas residuais com um produto químico em estudo e de uma unidade de controlo que apenas processa efluentes, procede-se a uma transferência de lamas diária (1). Este processo designa-se por interligação e o método é conhecido por método das unidades interligadas. A interligação começou por ser efetuada por recurso a unidades de Husmann de lamas ativadas, mas, posteriormente, foram também utilizadas unidades de vasos porosos (2) (3). Não foram registadas diferenças significativas, em termos de resultados, entre unidades interligadas ou não, quer se trate de unidades Husmann ou de vasos porosos, pelo que não se justifica o dispêndio de tempo e energia com a interligação de unidades.

O intercâmbio de lamas pode dar a impressão de ocorrência de uma remoção considerável, uma vez que uma parte do produto químico em estudo nas lamas transferidas e as concentrações do mesmo nos efluentes de ensaio e de controlo são praticamente iguais. É, pois, necessário utilizar fatores de correção, consoante a fração em causa e o tempo médio de retenção hidráulica. A referência (1) contém mais pormenores para o cálculo.

Calcular o valor corrigido do grau de eliminação do COD ou da CQO utilizando a seguinte fórmula geral:

$$D_{tc} = (D_t - 100 \cdot a \cdot r/12)/(1 - a \cdot r/12)\ \%$$

em que:

D_{tc} = % corrigida de eliminação do COD ou da CQO

D_t = % determinada de eliminação do COD ou da CQO

a = fração trocada do volume das unidades de lamas ativadas

r = tempo médio de retenção hidráulica (h)

Se, por exemplo, metade do volume do recipiente de arejamento for trocada (a = 0,5) e o tempo médio de retenção hidráulica for de 6 h, a fórmula de correção é a seguinte:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

REFERÊNCIAS

(1) Fischer W, Gerike P, Holtmann W (1975): Biodegradability Determinations via Unspecific Analyses (Chemical Oxygen Demand, DOC) in Coupled Units of the OECD Confirmatory Test. I The test. *Wat. Res*. 9: 1131-1135.

(2) Painter HA, Bealing DJ (1989): Experience and Data from the OECD Activated Sludge Simulation Test. p. 113-138. In: Laboratory Tests for Simulation of Water Treatment Processes CEC Water Pollution Report 18. Eds. Jacobsen BN, Muntau H, Angeletti G.

(3) Painter HA, King EF (1978): Water Research Centre Porous Pot Method for Assessing Biodegradability. Technical Report TR70, Water Research Centre, Stevenage, Reino Unido.

▼M4

Apêndice 4

AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DAS LAMAS ATIVADAS

Processamento dos produtos químicos em estudo

1. Um produto químico (ou uma água residual) pode não ser degradado ou removido no ensaio de simulação, podendo mesmo apresentar um efeito inibidor nos microrganismos presentes nas lamas. Alguns produtos químicos são biodegradados a baixas concentrações, mas são inibidores a concentrações mais elevadas (hormese). Os efeitos inibidores podem ser detetados numa fase precoce ou podem ser determinados por recurso a um ensaio de toxicidade, utilizando um inóculo semelhante ou idêntico ao utilizado no ensaio de simulação (1). Estes métodos consistem na inibição do consumo de oxigénio (capítulo C.11 do presente anexo (2) e norma ISO 8192, n.º 3) ou na inibição do crescimento dos organismos das lamas (ISO 15522, n.º 4).

2. No ensaio de simulação, observa-se inibição se a diferença de teores de COD ou CQO entre os efluentes do recipiente de ensaio e do recipiente de controlo for superior ao COD correspondente ao produto químico em estudo. Por outras palavras, a percentagem de remoção de COD (ou de CBO, CQO, e/ou NH^{+}_{4}) do meio orgânico tratado baixará devido à presença do produto químico em estudo. Caso tal suceda, o ensaio deve ser repetido, reduzindo-se a concentração do produto químico em estudo até ser atingido um nível em que não ocorra inibição e, eventualmente, até o produto ser biodegradado. Se o produto químico, ou as águas residuais, em estudo revelarem efeitos negativos no processo a todas as concentrações testadas, isso indica que o processamento biológico do produto é difícil, ou mesmo impossível; poderá, contudo, ser interessante repetir o ensaio com lamas ativadas de origem diferente e/ou submetendo as lamas a uma aclimatação mais gradual.

3. Reciprocamente, se o produto químico em estudo for bioeliminado no primeiro ensaio de simulação, a sua concentração deve ser aumentada, caso se pretenda conhecer os seus possíveis efeitos de inibição.

4. Nas tentativas para determinar os graus de inibição, importa recordar que as populações colonizadoras das lamas ativadas podem variar, pelo que, com o tempo, os microrganismos podem exibir tolerância a uma substância inibidora.

5. Cálculo do grau de inibição:

   A percentagem global de remoção (R_o), de CBO, COD, CQO, etc., das unidades de ensaio e de controlo, pode ser calculada com base na equação:

$$R_o = 100\ (I - E)/\ I\%$$

   em que:

   I = concentração de CBO, DOC, COD, etc. no afluente, nos recipientes de ensaio ou de controlo (mg/l)

   E = mesmas concentrações no efluente (mg/l).

   Os valores de I e E devem ser corrigidos para ter em conta o COD atribuível ao produto químico em estudo nas unidades de ensaio, sem o que os cálculos da percentagem de inibição serão incorretos.

▼**M4**

O grau de inibição decorrente da presença do produto químico em estudo é calculado a partir da equação:

$$\% \text{ inibição} = 100\ (R_c - R_t)/R_c$$

em que:

R_c = percentagem de remoção nos recipientes de controlo

R_t = percentagem de remoção nos recipientes de ensaio

REFERÊNCIAS

(1) Reynolds L *et al.* (1987): Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. *Chemosphere* 16: 2259.

(2) Captítulo C.11 deste anexo: "Biodegradação — Lamas Ativadas: Ensaios de Inibição da Respiração".

(3) ISO 8192 (2007) Water quality — Test for inhibition of oxygen consumption by activated sludge for carbonaceous and ammonium oxidation.

(4) ISO 15522 (1999) Water Quality — Determination of the inhibitory effect of water constituents on activated sludge microorganisms.

▼M4

Apêndice 5

Produtos químicos em estudo pouco solúveis em água — substâncias voláteis

Produtos químicos pouco solúveis em água

Foram publicados poucos relatórios sobre ensaios de simulação de tratamento de águas residuais com produtos químicos pouco solúveis ou insolúveis em água (1) (2) (3).

Não existe um método único de dispersão da substância em estudo aplicável a todos os produtos químicos insolúveis. Dois dos quatro tipos de métodos descritos na norma ISO 10634 (4) afiguram-se adequados à dispersão dos produtos químicos destinados a ensaios de simulação: trata-se do recurso a agentes emulsionantes e/ou à energia ultrassónica.

Deve determinar-se a estabilidade da dispersão em períodos de, pelo menos, 24 horas.

As dispersões, devidamente estabilizadas, contidas num recipiente com agitação constante (ponto 38), são transferidas para um tanque de arejamento separadamente das águas residuais domésticas ou sintéticas.

Se as dispersões forem estáveis, investigar de que forma o produto químico poderá ser determinado na forma dispersa. É improvável que a determinação do COD seja adequada, devendo, por isso, definir-se para a análise do produto químico um método específico passível de ser aplicado a efluentes, sólidos provenientes de efluentes e lamas ativadas. Pode, então, determinar-se o comportamento do produto no processo de simulação das lamas ativadas, nas fases líquida e sólida. Deve, pois, estabelecer-se um "balanço de massas" para decidir se o produto químico em estudo foi biodegradado. No entanto, esse parâmetro indica apenas a biodegradação primária. Para comprovar a biodegradação final, deve utilizar-se um ensaio respirométrico da biodegradabilidade imediata (capítulo C.4 do presente anexo (5) C, F ou D), utilizando como inóculo lamas expostas ao produto químico em estudo no ensaio de simulação.

Produtos químicos voláteis

A simulação do tratamento das águas residuais com produtos químicos voláteis é discutível e problemática. Tal como no caso dos produtos químicos de baixa solubilidade em água, têm sido publicados muito poucos relatórios sobre ensaios de simulação com produtos químicos voláteis. Um dispositivo de mistura de tipo clássico pode ser adaptado, tapando os tanques de arejamento e de sedimentação, medindo e controlando o fluxo de ar por recurso a fluxómetros e fazendo passar os gases libertados por coletores, para recolha das matérias orgânicas voláteis. Em alguns casos, utiliza-se uma bomba de vácuo para drenar os gases através de um coletor a frio ou de um coletor com purga que contenha Tenax e silica-gel, para análise por cromatografia em fase gasosa. O produto químico em estudo presente no coletor pode ser determinado por via analítica.

O ensaio é efetuado em duas fases. Na primeira fase, as unidades são utilizadas sem lamas, mas com águas residuais sintéticas, sendo o produto químico em estudo bombeado para o tanque de arejamento. São colhidas amostras de afluente, efluente e de gases libertados e analisadas para deteção do produto químico em estudo, durante alguns dias. A percentagem (R_{vs}) deste removida do sistema pode calcular-se a partir dos dados recolhidos.

Em seguida, realiza-se o ensaio biológico normal (com lamas), em condições operacionais idênticas às utilizadas no ensaio de remoção. Efetuam-se também medições do COD ou da CQO, para verificar se as unidades estão a funcionar de forma eficaz. Ocasionalmente, efetua-se análises para determinar a concentração de produto químico em estudo no afluente, no efluente e nos gases libertados, na primeira parte do ensaio; após a aclimatação, efetua-se análises com uma maior frequência. É igualmente possível calcular, a partir dos dados no estado estacionário, a percentagem de eliminação do produto químico em estudo da fase líquida (R_T) por todos os processos (físicos e biológicos), bem como a proporção removida do sistema (R_V).

▼**M4**

Cálculos:

a) No ensaio não biológico, a percentagem (R_{VP}) de produto químico em estudo removido do sistema pode calcular-se com base na fórmula:

$$R_{VP} = \frac{S_{VP}}{S_{IP}} \cdot 100$$

em que

R_{VP} = remoção do produito químico em estudo por volatilização (%),

S_{VP} = produto químico em estudo recolhido no coletor, expresso em concentração equivalente na fase líquida (mg/l),

S_{IP} = concentração do produto químico em estudo no afluente (mg/l).

b) No ensaio biológico, a percentagem (R_V) de produto químico em estudo removida do sistema pode calcular-se com base na fórmula:

$$R_V = \frac{S_V}{S_I} \cdot 100$$

em que

R_V = remoção do produto químico em estudo por volatilização, no ensaio biológico (%)

S_V = produto químico em estudo recolhido no coletor, no ensaio biológico, expresso em concentração equivalente no afluente líquido (mg/l),

S_I = concentração do produto químico em estudo no afluente (mg/l).

c) No ensaio biológico, a percentagem (R_T) de produito químico em estudo removida por todos os processos é dada por:

$$R_T = 1 - \frac{S_E}{S_I} \cdot 100$$

em que

S_E = concentração de produto químico em estudo no efluente líquido (mg/l).

d) Assim, a percentagem (R_{BA}) removida por biodegradação e adsorção é calculada da seguinte forma:

$$R_{BA} = (R_T - R_V)$$

Deve realizar-se ensaios separados para determinar se o produto químico em estudo é adsorvido; se for o caso, pode efetuar-se uma nova correção.

e) Uma comparação entre a proporção de produto químico em estudo removida nos sistemas de ensaio biológico (R_v) e não biológico (R_{vp}) indica os efeitos globais do tratamento biológico na emissão da produto para a atmosfera.

Exemplo: Benzeno

Tempo de retenção nas lamas = 4 dias

Tempo de retenção nas águas residuais sintéticas = 8 horas

S_{IP} = S_I = 150 mg/l

S_{VP} = 150 mg/l (S_{EP} = 0)

S_V = 22,5 mg/l

S_E = 50 µg/l

▼**M4**

Assim,

R_{VP} = 100 %, R_V = 15 %

R_T = 100 % e R_{BA} = 85 %.

Conclui-se que o benzeno não é adsorvido pelas lamas.

REFERÊNCIAS

(1) Horn J.A., Moyer J.E., Hale J.H. (1970). Biological degradation of tertiary butyl alcohol. Proc. 25th Ind. Wastes Conference Purdue Univ.: 939-854.

(2) Pitter P., Chudoba J. (1990). Biodegradability of organic substances in the aquatic environment. CRC Press. Boston, USA.

(3) Stover E.L., Kincannon D.F. (1983): Biological treatability of specific organic compounds found in chemical industry waste waters. J. Wat. Pollut. Control Fed. 55: 97.

(4) ISO 10634 (1995) Water Quality — Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

(5) Capítulo C.4 deste anexo:"Determinação da biodegradabilidade 'fácil' ".

▼M4

Apêndice 6

Efeitos do tempo de retenção das lamas (SRT) na capacidade de tratamento dos produtos químicos

INTRODUÇÃO

1. O método descrito no texto principal foi concebido para verificar se os produtos químicos sujeitos a ensaio (geralmente aqueles cuja biodegradabilidade inerente é conhecida, mas não a "fácil") podem ser biodegradados nos limites impostos nas estações de tratamento de águas residuais. Os resultados são expressos em termos de percentagem de remoção e percentagem de biodegradação. As condições de funcionamento das unidades de lamas ativadas e a escolha do afluente permitem grandes variações de concentração do produto químico em estudo no efluente. Os ensaios são efetuados apenas com uma concentração nominal de lamas sólidas ou um tempo de retenção nominal (SRT); os caudais de remoção das lamas descritos podem causar variações consideráveis do SRT durante o ensaio, tanto de dia para dia como num determinado dia.

2. Nesta variante (1) (2), o SRT é mantido entre limites muito mais estreitos em cada período de 24 horas (tal como acontece em grande escala), o que resulta numa concentração mais constante nos efluentes. Recomenda-se a utilização de águas residuais domésticas, que proporciona uma percentagem de remoção mais constante e elevada. Além disso, investigam-se os efeitos de uma série de valores de STF; num estudo mais pormenorizado, podem estudar-se os efeitos da variação da temperatura na concentração do efluente.

3. Ainda não há consenso quanto aos modelos cinéticos implicados na biodegradação nas condições de tratamento de águas residuais. O modelo de Monod de crescimento bacteriano e a utilização do substrato foram selecionados (1)(2) para aplicação aos dados recolhidos, uma vez que o método se destinava a ser aplicado apenas a produtos químicos produzidos em grandes quantidades, que produziam concentrações superiores a 1 mg/l nas águas residuais. A validade do modelo simplificado e os pressupostos assumidos foram estabelecidos por recurso a uma série de etoxilatos de etilo com diversos graus de biodegradabilidade primária (2)(3).

Nota: Este método alternativo segue de perto o método descrito (C.10-A), apenas diferindo nos aspetos que se indicam de seguida.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

4. Utiliza-se unidades de vasos porosos com lamas ativadas, concebidas para facilitar a remoção quase contínua do meio fluido misto, de forma a permitir um controlo muito preciso do tempo de retenção das lamas (SRT, ou θ_s), de modo não interligado, numa determinada gama de SRT e, eventualmente, numa determinada gama de temperaturas. Em geral, o tempo de retenção é de 2 a 10 dias, a uma temperatura compreendida entre 5 e 20 °C. As águas residuais, de preferência domésticas, e uma solução do produto químico em estudo são colocadas separadamente nas unidades a caudais que proporcionem o tempo de retenção requerido (três a seis horas) e a concentração requerida do produto no afluente. Paralelamente, para fins comparativos, utilizam-se unidades de controlo sem adição do produto químico em estudo.

5. Pode utilizar-se outros tipos de equipamentos, devendo porém fazer-se o possível para assegurar o controlo dos SRT. Por exemplo, no caso de instalações munidas de um decantador, pode ser necessário ter em conta a perda de sólidos através dos efluentes. Além disso, deve tomar-se precauções especiais para evitar erros atribuíveis à variação da quantidade de lamas no decantador.

▼M4

6. Faz-se funcionar as unidades com cada conjunto selecionado de condições; ao atingir o equilíbrio, medem-se as concentrações estacionárias médias do produto químico em estudo e, eventualmente, o COD nos efluentes, num período de cerca de três semanas. Além de avaliar a percentagem de remoção do produto químico em estudo e, opcionalmente, o COD, determina-se, na forma de gráfico, a relação entre as condições de funcionamento da instalação e a concentração do produto no efluente. A partir do gráfico, pode calcular-se as constantes cinéticas e prever-se as condições de processamento do produto químico em estudo.

INFORMAÇÕES SOBRE O PRODUTO QUÍMICO EM ESTUDO

7. Aplica-se o descrito no capítulo C.10-A, pontos 12 e 13.

NÍVEIS DE APROVAÇÃO

8. Aplica-se o descrito no capítulo C.10-A, pontos 14 e 15.

SUBSTÂNCIA DE REFERÊNCIA

9. Aplica-se o descrito no capítulo C.10-A, ponto 16.

REPRODUTIBILIDADE DOS RESULTADOS DOS ENSAIOS

10. Aplica-se o descrito no capítulo C.10-A, pontos 17 e 18.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Dispositivos

11. O sistema de vasos porosos modificado (apêndice 6.1) constitui uma unidade adequada. Consiste num recipiente interno (ou revestimento) de polipropileno poroso com 3,2 mm de espessura e porosidade aproximada 90 μm, com juntas soldadas topo a topo, o que torna esta unidade mais robusta do que a descrita no ponto 21 do presente capítulo, C.10-A. O revestimento é colocado num recipiente exterior de polietileno impermeável, composto por duas partes, designadamente uma base circular em que se abrem orifícios destinados a receber duas linhas de ar e um tubo para remoção das lamas, e um cilindro superior aparafusado à base, com uma saída posicionada de forma a proporcionar um volume conhecido (3 l) ao recipiente de vasos porosos. Uma das condutas de ar é munida de uma pedra difusora; a outra tem uma extremidade aberta, estando posicionada perpendicularmente à pedra no recipiente. Este sistema produz a agitação necessária para assegurar a mistura completa do conteúdo do vaso, bem como concentrações de oxigénio dissolvido superiores a 2 mg/l.

12. As unidades, em número adequado, são mantidas a temperaturas controladas na gama 5-20 °C (± 1 °C), quer por meio de banhos-maria quer mantendo a temperatura da zona a um nível constante. São necessárias bombas para transferir a solução Do produto químico em estudo, bem como as águas residuais decantadas, para os recipientes de arejamento, com o caudal requerido (0-1,0 ml/min e 0-25 ml/min, respetivamente), e uma terceira bomba para remover os resíduos de lamas dos recipientes de arejamento. O necessário caudal muito baixo de resíduos de lamas é obtido por recurso a uma bomba fixada a um caudal mais elevado, funcionando de forma intermitente sob o comando de um temporizador (por exemplo, 10 segundos por minuto, com um caudal de 3 ml/min, produzindo, assim, uma taxa de remoção de 0,5 ml/min).

Dispositivo de filtração ou centrifugação

13. Aplica-se o descrito no capítulo C10 A, ponto 23.

Equipamento de análise

14. Aplica-se o descrito no capítulo C.10-A, ponto 24.

Água

▼**M4**

15. Aplica-se o descrito no capítulo C.10-A, pontos 25 e 26.

Meio orgânico

16. Aplica-se o descrito no capítulo C.10-A, ponto 27.

Águas residuais sintéticas

17. Aplica-se o descrito no capítulo C.10-A, ponto 28.

Águas residuais domésticas

18. Aplica-se o descrito no capítulo C.10-A, ponto 29.

Lamas ativadas

19. Aplica-se o descrito no capítulo C10 A, ponto 30.

Soluções-mãe do produto químico em estudo

20. Aplica-se o descrito no capítulo C.10-A, pontos 31 e 32.

PROCEDIMENTO

Preparação do inóculo

21. Aplica-se o descrito no capítulo C.10, ponto 34 — utilizar lamas ativadas (cerca de 2,5 g/l).

Número de unidades de ensaio

22. Para um ensaio simples, ou seja, para medir a percentagem de eliminação, apenas é necessário um STF; contudo, para obter os dados necessários ao cálculo das constantes cinéticas, deve dispor-se de 4 ou 5 valores de STF. Selecionam-se, em geral, valores compreendidos entre 2 e 10 dias. Na prática, é conveniente realizar em simultâneo um ensaio com 4 ou 5 SRT, a uma dada temperatura, em estudos mais aprofundados, utilizam-se os mesmos SRT, ou, eventualmente, uma gama diferente de valores, a outras temperaturas na gama 5-20 °C. Para a biodegradação primária (principal utilização), apenas se necessita, em geral, de uma unidade por conjunto de condições. No entanto, para a determinação da biodegradabilidade final, é necessária, para cada conjunto de condições, uma unidade de controlo que processe as águas residuais sem o produto químico em estudo. Caso se suponha que este está presente nas águas residuais utilizadas, é necessário recorrer a unidades de controlo para avaliar a biodegradação primária e efetuar as necessárias correções nos cálculos.

Introdução do meio orgânico e do produto químico em estudo

23. Aplica-se o descrito no capítulo C.10-A, pontos 36 a 39; de salientar, contudo, que o produto químico em estudo é adicionado separadamente e que são utilizados vários caudais de remoção de lamas. Controlar e ajustar também frequentemente, se necessário, com uma precisão de 10 %, os caudais dos afluentes, dos efluentes e da remoção de lamas, por exemplo, duas vezes por dia. Se surgirem dificuldades com os métodos analíticos ao utilizar águas residuais domésticas, realizar o ensaio com o efluente sintético, garantindo, porém, que os meios diferentes originam dados cinéticos comparáveis.

Processamento das lamas ativadas

24. Aplica-se o descrito no capítulo C.10-A, pontos 40 a 43, controlando, porém, o SRT através da eliminação constante de lamas.

Amostragem e análise

25. Aplica-se o descrito no capítulo C.10-A, pontos 44 a 50, determinando obrigatoriamente a concentração do profuto químico em estudo e, facultativamente, o COD; não deve utilizar-se a CQO.

▼M4

DADOS E RELATÓRIOS

Tratamento dos resultados

26. Aplica-se o descrito no capítulo C.10-A, pontos 52 a 54.

Apresentação dos resultados do ensaio

27. Aplica-se o descrito no capítulo C.10-A, pontos 56 a 62.

Cálculo das constantes cinéticas

28. É mais realista exprimir a concentração média do produto químico em estudo no efluente, no estado estacionário, e descrever o modo como varia, nas condições de funcionamento da instalação, do que exprimir a percentagem de biodegradação primária. Para tal, pode recorrer-se à equação (6) do apêndice 6.2, que pode fornecer valores para os parâmetros K_S, μ_m e θ_{SC}, tempo crítico de retenção das lamas.

(em alternativa, podem obter-se valores de K_S e μ_m utilizando um programa informático simples que adapte aos valores experimentais obtidos a curva teórica determinada a partir da equação 2 (apêndice 6.2). Embora a solução obtida não seja única, pode obter-se um valor aproximado razoável dos parâmetros K_S e μ_m).

Variabilidade dos resultados

29. Sabe-se pela experiência que cada produto químico produz valores diferentes de parâmetros cinéticos. Pensa-se que as condições de cultivo das lamas, bem como as condições de ensaio utilizadas (cf. ponto 5 e outros ensaios), influenciam de modo considerável os valores obtidos. Um aspeto desta variabilidade foi debatido por Grady *et al.* (4), que sugeriram a utilização dos termos "permanentes" e "intrínsecas" para qualificar duas condições extremas que representam os limites do estado fisiológico de uma cultura durante um ensaio cinético. Se não forem possíveis mudanças de estado durante o ensaio, os valores dos parâmetros cinéticos refletem as condições do ambiente do qual foram extraídos os microrganismos; estes valores são chamados "permanentes". No extremo oposto, se as condições de ensaio forem de molde a permitir o pleno desenvolvimento do sistema de síntese proteica que proporcione a taxa de crescimento máxima, os parâmetros cinéticos obtidos são "intrínsecos" e apenas dependentes da natureza do substrato e dos tipos de bactérias na cultura. A título de orientação, os valores existentes são obtidos mantendo um rácio baixo (por exemplo, 0,025) de concentração do substrato para microrganismos adequados (S_o/ /X_o), surgindo os valores intrínsecos quando o rácio é elevado (por exemplo, não inferior a 20). Em ambos os casos, o valor S_o deve ser igual ou superior ao valor de Ks (constante de auto-saturação).

30. A variabilidade, juntamente com outros aspetos da cinética da biodegradação, foi debatida num seminário recente da SETAC (5). Esses estudos, realizados ou projetados, permitirão uma visão mais clara da cinética dos processos nas estações de tratamento de águas residuais, tendo em vista uma melhor interpretação dos dados existentes e propor modelos mais adequados para os futuros métodos de ensaio.

REFERÊNCIAS:

(1) Birch R.R. (1982). The biodegradability of alcohol ethoxylates. XIII *Jornado Com. Español Deterg*.: 33-48.

(2) Birch R.R. (1984). Biodegradation of nonionic surfactants. J.A.O.C.S., 61(2): 340-343.

(3) Birch R.R. (1991). Prediction of the fate of detergent chemicals during sewage treatment. *J. Chem. Tech. Biotechnol*., 50: 411-422.

▼**M4**

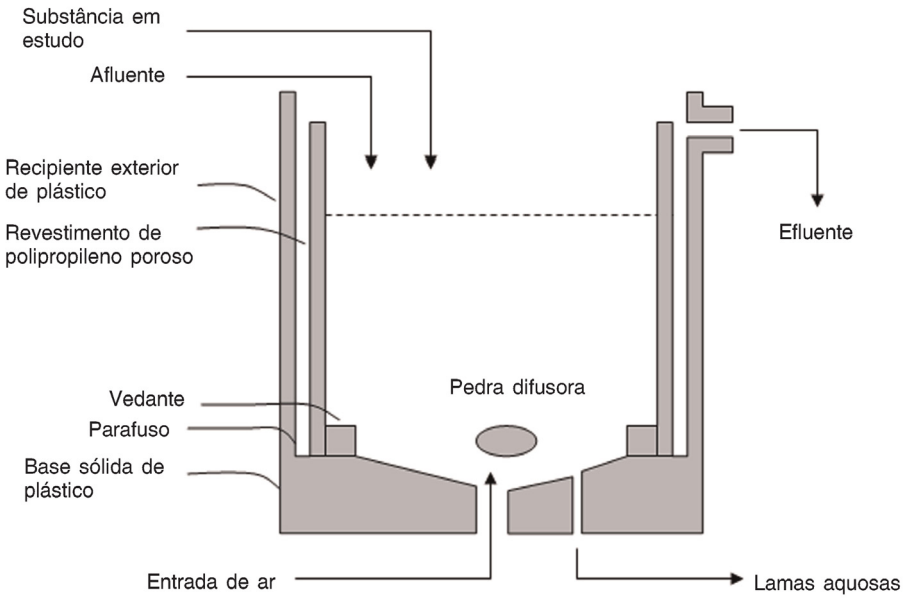
(4) Grady C.P.L., Smets B.F., Barbeau D.S. (1996). Variability in kinetic parameter estimates: A review of possible causes and a proposed terminology. *Wat. Res*., 30 (3): 742-748.

(5) Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997). Workshop realizado em Port Sunlight, Reino Unido. Eds. Hales S.G., Feitjel T., King H., Fox K., Verstraete W. 4-6 Set. 1996. SETAC- Europe, Bruxelas.

▼**M4**

Apêndice 6.1

Vaso poroso com controlo do SRT



▼M4

Apêndice 6.2

Cálculo das constantes cinéticas

1. Assumindo a aplicabilidade da cinética de Monod e um equilíbrio de massas dos sólidos ativos e do substrato no sistema de lamas ativadas (1), podem obter-se as seguintes expressões para os estados estacionários:

$$\frac{1}{\theta_s} = \frac{\mu_m \cdot S_1}{K_s + S_1} - K_d \qquad [1]$$

ou

$$S_1 = \frac{K_s \cdot (1 + K_d \cdot \theta_s)}{\theta_s \cdot (\mu_m - K_d) - 1} \qquad [2]$$

em que

S_1 = concentração de substrato no efluente (mg/l)

K_S = constante de meia saturação (concentração à qual $\mu = \mu_m/2$ (mg/l)

μ = taxa de crescimento específica (d^{-1})

μ_m = valor máximo de μ_m (d^{-1})

K_d = taxa de eliminação específica dos sólidos ativos (d^{-1})

θ_S = tempo médio de retenção das lamas, SRT (d)

O exame desta equação conduz às seguintes conclusões:

i) a concentração do efluente é independente da do afluente (S_0); por conseguinte, a percentagem de biodegradação varia com a concentração do efluente, S_0;

ii) o único parâmetro de controlo da instalação que afeta a concentração S_1 é o tempo de retenção das lamas, θ_S;

iii) a cada concentração no afluente, S_0, corresponde um tempo crítico de retenção das lamas, da seguinte forma:

$$\frac{1}{\theta_{SC}} = \frac{\mu_s \cdot S_0}{K_s + S_0} - K_d \qquad [3]$$

em que

θ_{SC} = tempo crítico de retenção das lamas, abaixo do qual os microrganismos competentes são eliminados da instalação.

iv) uma vez que os outros parâmetros da equação (2) estão associados à cinética do crescimento, a temperatura é suscetível de afetar o nível de substrato no efluente e o tempo de permanência crítico das lamas, ou seja, o tempo de retenção das lamas necessário para obter um certo nível de tratamento aumenta à medida que diminui a temperatura.

2. A partir de um equilíbrio de massas de sólidos no sistema de vasos porosos, e partindo do princípio de que a concentração de sólidos no efluente da instalação, X_2, é reduzido em comparação com a do tanque de arejamento, X_1, o tempo de retenção das lamas é dado por:

$$\theta_s = \frac{V \cdot X_1}{(Q_0 - Q_1) \cdot X_2 + Q_1 \cdot X_1} \qquad [4]$$

▼**M4**

e

$$\theta_s = \frac{V \cdot X_1}{Q_1 \cdot X_1} = \frac{V}{Q_1}$$

em que

V = volume do tanque de arejamento (l)

X_1 = concentração de sólidos no tanque de arejamento (mg/l)

X_2 = concentração de sólidos no efluente (mg/l)

Q_0 = caudal do afluente (l/d)

Q_1 = caudal dos resíduos de lamas (l/d)

É, pois, possível manter o tempo de retenção das lamas a um determinado valor pré-selecionado através do controlo do caudal dos resíduos de lamas, Q_1.

Conclusões

3. O principal objetivo do ensaio consiste em permitir prever a concentração do efluente e, por conseguinte, os níveis do produto químico em estudo nas águas recetoras.

4. Representando graficamente S_1 *versus* θ_S, pode, por vezes, avaliar-se rapidamente o tempo crítico de retenção das lamas, θ_{SC} (exemplo: curva 3 da figura 1). Se tal não for possível, pode calcular-se θ_{SC}, obtendo também valores aproximados de μ_m e K_S, representando S_1, *versus* $S_1 \bullet \theta_S$.

Rearranjando a equação (1), obtém-se

$$\frac{S_1 \cdot \theta_s}{1 + \theta_s \cdot K_d} = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \qquad [5]$$

Se o valor K_d for baixo, $1 + \theta_s \bullet K_d \sim 1$ e a equação [5] assume a forma:

$$S_1 \cdot \theta_s = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \qquad [6]$$

O gráfico deve, pois, ser uma linha reta (figura 2) de declive $1/\mu_m$ e ordenada na origem K_S/μ_m; além disso, $\theta_S \sim 1/\mu_m$.

▼M4

Figura 1

Três temperaturas; cinco SRT

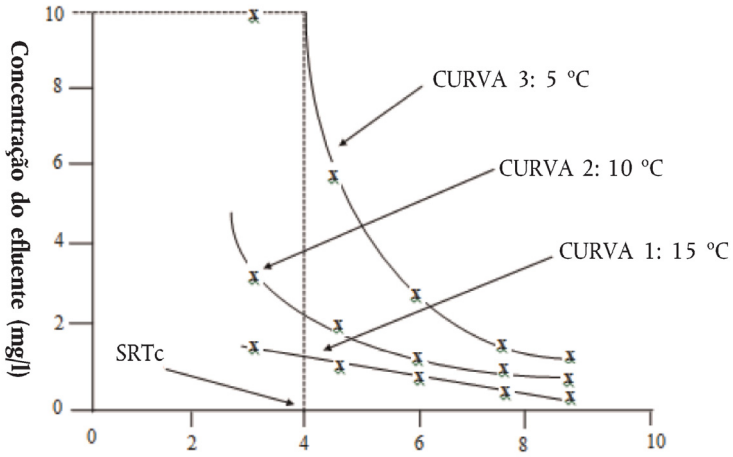
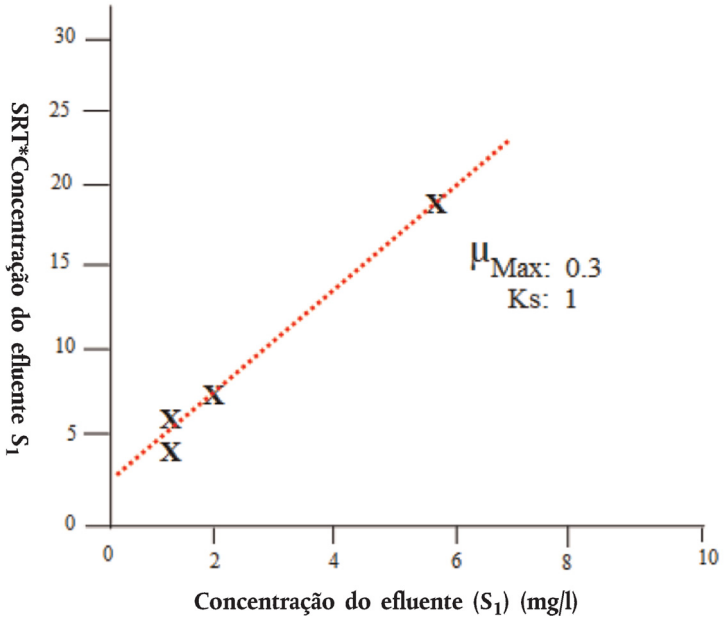


Figura 2

Regressão linear SRT · S_1 *versus* S_1 (T = 5 °C)



Glossário:

Concentração do efluente

Curva

▼M4

Apêndice 7

ENSAIO NUMA GAMA BAIXA DE CONCENTRAÇÕES (µg/l)

1. Muitos produtos químicos encontram-se presentes no meio aquático, inclusive nas águas residuais, a muito baixas concentrações (µg/l). Nessas concentrações, não podem, provavelmente, constituir substratos primários para o crescimento bacteriano, mas é maior a probabilidade de se decomporem como substratos secundários, em competição com uma vasta gama de compostos de carbono de ocorrência natural. A decomposição desses produtos não se adapta, pois, ao modelo descrito no apêndice 6. Existem vários modelos suscetíveis de serem aplicados e, nas condições inerentes aos sistemas de tratamento de águas residuais, pode utilizar-se mais de um sistema em simultâneo. É necessário prosseguir a investigação com vista a elucidar esta questão.

2. Entretanto, pode seguir-se o procedimento descrito no texto principal (capítulo C.10-A), mas apenas no respeitante à biodegradabilidade primária, utilizando uma gama adequada de baixas concentrações (< 100 µg/l) e um procedimento analítico validado. A percentagem de biodegradação pode ser calculada (ponto 54 do método de ensaio) tendo em conta os processos abióticos (adsorção, volatilidade etc.). Nyholm e seus colaboradores (1)(2) realizaram um estudo utilizando um ciclo de 4 h num sistema "enchimento--esvaziamento", tendo comunicado a obtenção de constante de pseudo-primeira ordem para cinco produtos químicos adicionados a um efluente sintético (5 a 100 µg/l). No caso da biodegradabilidade final, podem utilizar-se substâncias marcadas com ^{14}C. A descrição deste procedimento excede o âmbito do presente método de ensaio, dado não existirem ainda procedimentos aprovados, embora tenha sido proposto um método (ISO 14592 (3)) que contém orientações para a utilização de produtos químicos marcadas com ^{14}C.

Ensaio SCAS

3. Posteriormente, foi proposto um ensaio mais simples, em duas fases (4)(5)(6); o método semi-contínuo das lamas ativadas (*semi-continuous activated sludge* - SCAS) é seguido de ensaios cinéticos curtos com amostras colhidas nas unidades SCAS. Contrariamente ao método de ensaio original C.12, o sistema SCAS funciona com caudais conhecidos de remoção de lamas e utiliza águas residuais sintéticas OCDE ou águas residuais domésticas. Em virtude da variabilidade do pH e da reduzida decantabilidade das lamas, as águas residuais sintéticas são modificadas por adição de tampão de fosfatos, extrato de levedura, cloreto de ferro (III) e quantidades vestigiais de sais, sendo a sua CQO aumentada para cerca de 750 mg/l através do reforço da concentração de peptona e extrato de carne. As unidades funcionam num ciclo de 24 h: arejamento durante 23 h, remoção das lamas, decantação, remoção do sobrenadante (efluente) seguida de adição das águas residuais sintéticas com o produto químico em estudo, até perfazer 100 µg/l, (aproximadamente a mesma concentração utilizada no ensaio curto). Uma vez por semana, 10 % das lamas totais substituem-se por lamas recentes, para manter o equilíbrio da população microbiana.

4. Determinan-se as concentrações inciais e finais do produto químico em estudo no início e no final da fase de arejamento, prosseguindo-se o ensaio até se alcançar uma remoção constante do profuto químico, o que pode levar de uma semana a vários meses.

Ensaio curto

5. Efetua-se um ensaio curto (p.ex., oito horas) para determinar a constante cinética de pseudo-primeira ordem para a eliminação do produto químico em estudo em lamas ativadas com origens e historiais conhecidos mas diferentes. São colhidas, nomeadamente, amostras de lamas dos reatores SCAS, no termo de um período de arejamento (em que a concentração de substrato orgânico é baixa), num ensaio de aclimatação (pontos 3 e 4). Podem também recolher-se lamas de uma unidade SCAS paralela não exposta ao produto químico em estudo, para fins comparativos. Procede-se ao arejamento de

▼M4

misturas de lamas e do produto químico em estudo, adicionado em duas ou mais concentrações na gama 1-50 µg/l, sem águas residuais sintéticas ou outro substrato orgânico. O produto químico em estudo remanescente na solução é determinado a intervalos regulares (p.ex. de hora a hora), consoante a sua degradabilidade, por um período não superior a 24 h. As amostras são centrifugadas antes de sujeitas a análise adequada.

Cálculos

6. Os dados das unidades SCAS são utilizados para calcular a percentagem de remoção do produto químico em estudo (ponto 54). Por outro lado, a constante média de velocidade, K_1, (corrigida para ter em conta a concentração de sólidos em suspensão) pode ser calculada do seguinte modo:

$$K_1 = 1/t \cdot \ln \frac{C_e}{C_i} \cdot 1/SS(1/g\ h)$$

em que

t = tempo de arejamento (23 h)

C_e = concentração no final do período de arejamento (µg/l)

C_i = concentração no início do arejamento (µg/l)

SS = concentração de sólidos nas lamas ativadas (g/l)

7. No ensaio curto, o logaritmo da concentração percentual remanescente é representado em função do tempo; o declive da parte inicial (10-50 % de degradação) da curva é equivalente a K_1, constante de pseudo-primeira ordem. Esta é corrigida para ter em conta a concentração de sólidos nas lamas dividindo o declive por esta última concentração. Os resultados comunicados devem incluir pormenores relativos às concentrações iniciais de produto químico em estudo e de sólidos em suspensão, ao tempo de retenção das lamas, à origem e à carga destas e, se pertinente, à exposição prévia ao produto químico em estudo.

Variabilidade dos resultados

8. A variabilidade, juntamente com outros aspetos da cinética da biodegradação, foi debatida num seminário recente da SETAC (7). Esses estudos, realizados ou projetados, permitirão uma visão mais clara da cinética dos processos nas estações de tratamento de águas residuais, tendo em vista uma melhor interpretação dos dados existentes e propor modelos mais adequados para os futuros métodos de ensaio.

REFERÊNCIAS

(1) Nyholm N., Jacobsen B.N., Pedersen B.M., Poulsen O., Dambourg A., Schultz B. (1992). Removal of micropollutants in laboratory activated sludge reactors. Biodegradability. *Wat. Res*. 26: 339-353.

(2) Jacobsen B.N., Nyholm N., Pedersen B.M., Poulsen O., Ostfeldt P. (1993): Removal of organic micropollutants in laboratory activated sludge reactors under various operating conditions: Sorption. *Wat. Res*. 27: 1505-1510.

(3) ISO 14592 (ISO/TC 147/SC5/WG4, N264) (1998). Water Quality - Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations in water.

▼**M4**

(4) Nyholm N., Ingerslev F., Berg U.T., Pedersen J.P., Frimer-Larsen H. (1996): Estimation of kinetic rate constants for biodegradation of chemicals in activated sludge waste water treatment plants using short-term batch experiments and µg/l range spiked concentrations *Chemosphere* 33 (5): 851-864.

(5) Berg U.T., Nyholm N. (1996): Biodegradability simulation Studies in semi-continuous activated sludge reactors with low (µg/l range) and standard (ppm range) chemical concentrations. *Chemosphere* 33 (4): 711-735.

(6) Danish Environmental Protection Agency: (1996). Activated sludge biodegradability simulation test. Environmental Project, No. 337. Nyholm, N. Berg, U.T. Ingerslev, F. Min. of Env. and Energy, Copenhagen.

(7) Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997): *Workshop* realizado em Port Sunlight, Reino Unido. Eds. Hales, SG. Feitjel, T. King, H. Fox, K., Verstraete, W. 4-6 Set. 1996. SETAC- Europe, Bruxelas.

▼M4

C.10-B: Biofilmes

INTRODUÇÃO

1. Em geral, os ensaios de simulação aplicam-se a produtos químicos não aprovados num ensaio de rastreio da biodegradabilidade imediata [capítulo C.4, A a F, do presente anexo (9)], mas aprovados num ensaio de biodegradabilidade inerente. Excecionalmente, os ensaios de simulação podem também aplicar-se a qualquer produto químico em relação ao qual sejam necessárias mais informações, em especial produtos químicos produzidas em grandes quantidades, para o que se recorre, em geral, a um ensaio de lamas ativadas (C.10-A). Em alguns casos, contudo, são necessárias informações específicas sobre o comportamento de um produto químico com a aplicação de métodos de tratamento de águas residuais com recurso a biofilmes, nomeadamente filtros percoladores ou biológicos, contratores rotativos biológicos e leitos fluidizados. Para tal, foram desenvolvidos vários dispositivos.

2. Gerike *et al.* (1) utilizaram filtros biológicos de grandes dimensões, à escala-piloto, em modo interligado. Estes filtros ocupam muito espaço e necessitam de volumes relativamente elevados de águas residuais, sintéticas ou não. Truesdale *et al.* (2) descreveram um sistema que utiliza filtros mais pequenos (6 pés x 6 polegadas de diâmetro), alimentados com águas residuais naturais isentas de tensioativos, mas que requerem, mesmo assim, volumes elevados. Podem ser necessárias 14 semanas para a "maturação" de um bifilme e 4 a 8 semanas adicionais, após a primeira introdução do tensioativo em estudo, para que se registe aclimatação.

3. Baumann *et al.* (3) desenvolveram um filtro muito mais pequeno de poliéster "aveludado" previamente embebido em lama ativada (suporte inerte). O produto químico em estudo constitui a única fonte de carbono; a biodegradabilidade é avaliada através de determinações do carbono orgânico dissolvido (COD) no afluente e no efluente, bem como da quantidade de CO_2 nos gases libertados.

4. Gloyna *et al.* (4) utilizaram uma abordagem radicalmente diferente, tendo inventado o reator tubular rotativo. Procedeu-se à cultura de um biofilme na superfície interna do tubo rotativo, mediante passagem de afluente introduzido no topo do tubo, inclinado num ângulo ligeiro relativamente à horizontal. O reator foi utilizado para estudar a biodegradabilidade dos tensioativos (5), bem como para investigar a espessura ótima do biofilme e a difusão através do mesmo (6). Posteriormente, estes autores introduziram aperfeiçoamentos no reator, alterando-o, nomeadamente para poderem determinar o CO_2 nos gases libertados.

5. O reator tubular rotativo foi desenvolvido pelo *Standing Committee of Analysts* (Reino Unido) como método-padrão para avaliar a biodegradabilidade de produtos químicos (7) e a tratabilidade e toxicidade das águas residuais (8). O método que se descreve tem como vantagens a simplicidade, a compacidade, a reprodutibilidade e a necessidade de quantidades relativamente baixas de meio orgânico.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

6. As águas residuais, sintéticas ou domésticas, e o produto quíimico em estudo, simples ou em mistura, entram em contacto com a superfície interna de um tubo rotativo ligeiramente inclinado. Assiste-se à formação, na superfície interna, de uma camada de microrganismos semelhante à que se observa nos biofiltros. As condições de funcionamento do reator são escolhidas de forma a proporcionarem uma eliminação adequada da matéria orgânica e, se necessário, a oxidação do ião amónio.

▼M4

7. Recolhe-se o efluente do tubo, que é decantado e/ou filtrado antes da determinação do COD e/ou do produto químico em estudo por um método específico. As unidades de controlo que não utilizam o produto químico em estudo funcionam em paralelo, nas mesmas condições, para fins comparativos. Considera-se que a diferença entre as concentrações de COD nos efluentes das unidades de ensaio e de controlo é devida ao produto químico em estudo e aos seus metabolitos orgânicos. Esta diferença é comparada com a concentração do produto químico em estudo adicionado (expressa em COD), para o cálculo da eliminação deste.

8. Em princípio, é possível distinguir-se a biodegradação da bioadsorção através de um exame cuidadoso da curva eliminação *versus* tempo. Em geral, pode obter-se a confirmação por recurso a um ensaio de biodegradação rápida (consumo de oxigénio ou produção de dióxido de carbono), utilizando um inóculo aclimatado colhido, no final do ensaio, nos reatores nos quais foi adicionado o produto químico em estudo.

INFORMAÇÕES SOBRE O PRODUTO QUÍMICO EM ESTUDO

9. A pureza, a solubilidade em água, a volatilidade e as características de adsorção Do produto químico devem ser conhecidas, a fim de permitir a interpretação correta dos resultados.

10. Em geral, os produtos químicos voláteis e pouco solúveis não podem ser testados, salvo se forem tomadas precauções especiais (ver o capítulo C.10-A, apêndice 5). A estrutura química ou, pelo menos, a fórmula empírica, devem também ser conhecidas para o cálculo dos valores teóricos e/ou a confirmação dos valores medidos dos parâmetros, como, por exemplo, a carência teórica de oxigénio (CTeO) e o COD.

11. O facto de se dispor de informações sobre a toxicidade do produto químico em estudo para os microrganismos (ver o capítulo C.10-A, apêndice 4) pode ser útil para selecionar concentrações de ensaio adequadas e pode ser essencial para a interpretação correta de valores baixos de biodegradação.

NÍVEIS-LIMITE

12. No passado, os tensioativos tinham de apresentar uma biodegradação primária de, pelo menos, 80 %, para que os produtos pudessem ser comercializados. Para percentagens inferiores, pode recorrer-se ao presente ensaio de simulação (confirmação) e o tensioativo só pode ser comercializado se remover mais de 90 % do produto químico em causa. Com a generalidade dos produtos químicos, não se coloca a questão de exceder ou de não atingir a percentagem de remoção obtida, que pode ser utilizada no cálculo aproximado da concentração ambiental provável a utilizar na avaliação dos riscos dos produtos químicos. Numa série de estudos de produtos químicos puros, observou-se uma percentagem de remoção de COD superior a 90 % em mais de três quartos das amostras e superior a 80 % em mais de 90 % das produtos que revelaram um grau significativo de biodegradabilidade.

SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

13. A fim de garantir a execução correta do processo experimental, é importante submeter a ensaios ocasionais substâncias de referência de comportamento conhecido. Essas substâncias incluem o ácido adípico, o 2-fenilfenol, o 1-naftol, o ácido difénico e o ácido 1-naftóico.

REPRODUTIBILIDADE DOS RESULTADOS DOS ENSAIOS

14. Um laboratório no Reino Unido obteve os valores de 3,5 % para o desvio-padrão relativo intra-ensaios e de 5 % para o mesmo parâmetro inter-ensaios (7).

▼M4

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Equipamento

Reatores tubulares rotativos

15. O dispositivo (ver figuras 1 e 2 no apêndice 8) é constituído por um conjunto de tubos acrílicos, cada um dos quais com 30,5 cm de comprimento e 5 cm de diâmetro interno, suportados por rodas revestidas com borracha num suporte metálico. Cada tubo tem um entalhe exterior, com cerca de 0,5 cm de profundidade, para encaixe nas rodas; a superfície interna é endurecida com um fio de lã grosseira e existe um rebordo com 0,5 cm de profundidade na extremidade superior (alimentação) para reter o líquido. Os tubos estão inclinados num ângulo de aproximadamente um grau em relação à horizontal, de forma a proporcionar o tempo de contacto necessário quando o meio de ensaio é introduzido num tubo limpo. As rodas revestidas com borracha rodam por ação de um motor de velocidade lenta ajustável. A temperatura dos tubos é controlada por instalação num compartimento com temperatura constante.

16. Introduzindo cada reator tubular num tubo ligeiramente maior, tapado, e assegurando a impermeabilidade gasosa das vedações, é possível recolher numa solução alcalina o CO_2 libertado, para posterior determinação (6).

17. Durante 24 horas, introduz-se em cada tubo meio orgânico, se for caso disso com o produto químico em estudo, armazenado num recipiente de 20 l (a) (ver a figura 2). Se necessário, a solução do produto químico em estudo pode ser introduzida separadamente. Cada recipiente de armazenagem apresenta, junto do fundo, um orifício do qual sai um tubo de um material adequado (por exemplo, de borracha de silicone), que, passando por uma bomba peristáltica (b), se liga a um tubo adutor de vidro ou de um material acrílico, o qual se liga 2-4 cm acima da extremidade mais elevada (de alimentação) do tubo inclinado (C). O efluente sai pela extremidade inferior do tubo inclinado, sendo recolhido noutro recipiente de armazenagem (D). É decantado ou filtrado antes da análise.

Dispositivo de filtração-centrifugação

18. Dispositivo de filtração das amostras com filtros de membrana de porosidade adequada (diâmetro nominal da abertura: 0,45 m), que adsorva produtos químicos orgânicos solúveis ou liberte uma quantidade mínima de carbono orgânico. Caso se utilizem filtros que libertem carbono orgânico, lavá-los cuidadosamente com água quente, para eliminar o carbono orgânico lixiviável. Em alternativa, pode utilizar-se uma centrifugadora que produza 40 000 m/s^2.

19. Equipamento analítico para a determinação dos seguintes parâmetros:

— COD/carbono orgânico total (COT) ou carência química de oxigénio (CQO),

— produto químico específico (por HPLC, cromatografia em fase gasosa, etc.), se necessário,

— pH, temperatura, acidez, alcalinidade,

— amónio, nitritos e nitratos, se os ensaios forem executados em condições de nitrificação.

Água

20. Água da rede de abastecimento, com menos de 3 mg/l de COD.

21. Água destilada ou desionizada, com menos de 2 mg/l de COD.

▼M4

Meio orgânico

22. Podem ser utilizadas como meio orgânico águas residuais sintéticas, águas residuais domésticas ou uma combinação de ambas. Foi demonstrado que a utilização de águas residuais domésticas simples origina com frequência uma maior percentagem de remoção de COD em unidades de lamas ativadas, permitindo mesmo a biodegradação de alguns produtos químicos que não sofrem biodegradação quando se utiliza o efluente sintético OCDE. Recomenda-se, pois, a utilização de águas residuais domésticas. Determinar a concentração de COD (ou a CQO) de cada novo lote de meio orgânico. Deve conhecer-se a acidez ou a alcalinidade deste. Se a acidez ou a alcalinidade do meio orgânico for baixa, pode ser necessário adicionar-lhe um tampão adequado (hidrogenocarbonato de sódio ou hidrogenofosfato de potássio), para manter o pH no reator a cerca de 7,5 ± 0,5, durante o ensaio. A quantidade de solução-tampão e o momento em que é adicionada devem ser decididos caso a caso.

Águas residuais sintéticas

23. Dissolver. por litro de água da torneira: 160 mg de peptona; 110 mg de extrato de carne; 30 mg de ureia; 28 mg de hidrogenofosfato dipotássico anidro (K_2HPO_4); 7 mg de cloreto de sódio (NaCl); 4 mg de cloreto de cálcio di-hidratado ($CaCl_2.2H_2O$); 2 mg de sulfato de magnésio hepta-hidratado ($MgSO_4.7H_2O$). O efluente sintético OCDE constitui um exemplo e proporciona uma concentração média de COD no afluente de cerca de 100 mg/l. Em alternativa, podem utilizar-se composições mais próximas das das águas residuais em estudo, com uma concentração idêntica de COD. O efluente sintético, numa forma concentrada, pode ter por base água destilada, e ser armazenado a cerca de 1 °C durante uma semana, no máximo. Se necessário, diluir com água da rede de abastecimento (embora este meio não seja satisfatório — por exemplo, a concentração de azoto é muito elevada e o teor de carbono relativamente baixo —, não foram sugeridas alternativas melhores, exceto a adição de mais fosfato, no tampão, e de uma quantidade suplementar de peptona).

Águas residuais domésticas

24. Utilizar águas residuais recentemente decantadas, recolhidas diariamente numa instalação de tratamento que processe predominantemente esgotos domésticos. A amostra deve ser recolhida da conduta de alimentação do tanque de decantação primária, ou da conduta de alimentação da instalação de lamas ativadas, e ter a menor quantidade possível de partículas grosseiras. As águas residuais podem ser utilizadas após terem sido armazenadas durante vários dias a cerca de 4 °C, caso apresentem provas de que o COD (ou a CQO) não baixou significativamente (ou seja, mais de 20 %) durante a armazenagem. A fim de limitar perturbações do sistema, o COD (ou a CQO) de cada novo lote deve ser ajustado, antes da utilização, para um valor constante, por exemplo, através de diluição com água da rede de abastecimento.

Lubrificante

25. Para a lubrificação dos rolos da bomba peristáltica, podem utilizar-se glicerol ou azeite; ambos são adequados para utilização com tubos de borracha de silicone.

Soluções-mãe do produto químico em estudo

26. Se a solubilidade dos produtos químicos for adequada, preparar soluções-mãe de reserva de concentrações adequadas (por exemplo, 1 a 5 g/l) em água desionizada, ou na fração mineral do efluente sintético. No caso de produtos químicos insolúveis, ver o apêndice 5 do capítulo C.10-A. Este método não é aplicável a produtos químicos voláteis sem alterações dos reatores tubulares (ponto 16). Determinar o COD e o COT da solução-mãe, repetindo as medições para cada novo lote. Se a diferença entre o COD e o COT for superior a 20 %, verificar a solubilidade em água do produto químico em estudo. Comparar com o valor nominal o COD ou a concentração do mesmo produto determinados por análise específica da solução-mãe, de forma a averiguar

▼M4

se a recuperação é suficiente (em geral, deve ser superior a 90 %). Verificar, em especial no caso das dispersões, se o COD pode ou não ser utilizado como parâmetro analítico, ou se é necessário utilizar uma técnica analítica específica para o produto químico em causa. No caso das dispersões, é necessário proceder à centrifugação das amostras. Para cada novo lote, determinar o COD, a CQO ou o produto químico em estudo por meio de uma análise específica.

27. Determinar o pH da solução-mãe. A ocorrência de valores extremos indica que a adição do produto químico pode influenciar o pH das lamas ativadas no sistema de ensaio. Neste caso, neutralizar a solução de reserva com pequenas quantidades de ácido ou de base, de forma a obter um pH de 7,0 ± 0,5, evitando, contudo, a precipitação do produto químico em estudo.

PROCEDIMENTO

Preparação do meio orgânico para determinação

28. Assegurar que os recipientes do afluente e do efluente, bem como a conduta entre o primeiro e o segundo, são bem limpos, de forma a eliminar qualquer proliferação de flora microbiana antes do ensaio e durante o mesmo.

29. Preparar o efluente sintético (ponto 23) diariamente, a partir dos sólidos ou da solução-mãe concentrada, por diluição adequada com água da rede de abastecimento. Medir, numa proveta, a quantidade necessária e adicionar a um recipiente limpo destinado a receber o afluente. Se necessário, juntar também a quantidade necessária de solução-mãe do produto químico em estudo e da substância de referência ao efluente sintético, antes de efetuar a diluição. Se for mais prático, ou necessário para evitar perdas do produto químico em estudo, preparar separadamente uma solução diluída desta em estudo num recipiente específico e aduzi-la aos tubos inclinados através de uma bomba doseadora.

30. Em alternativa (e de preferência), utilizar águas residuais domésticas decantadas (ponto 24) recolhidas diariamente, se possível.

Funcionamento dos reatores tubulares rotativos

31. Para a determinação de um produto químico em estudo, são necessários dois reatores tubulares idênticos, montados num compartimento a temperatura constante (em geral, 22 ± 2 °C).

32. Ajustar as bombas peristálticas para um caudal de 250 ± 25 ml/h do meio orgânico (sem o produto químico em estudo) para os tubos inclinados, que se fazem rodar a 18 ± 2 rpm. Lubrificar (ponto 25) os tubos de bombagem no início, bem como, periodicamente, ao longo do ensaio, de modo a assegurar o seu bom funcionamento e prolongar a sua vida útil.

33. Ajustar o ângulo de inclinação dos tubos relativamente à horizontal, de forma a obter um tempo de permanência adequado das matérias nos tubos limpos de 125 ± 12,5. Estimar o tempo de retenção, adicionando à matéria-prima um marcador não biológico (p.ex. NaCl ou um corante inerte): o tempo necessário para atingir a concentração máxima no efluente é considerado o tempo médio de retenção (se estiver presente uma quantidade máxima de filme, o tempo de retenção pode aumentar até cerca de 30 min).

34. Os referidos caudais, velocidades e tempos são aqueles que se verificou conduzirem a taxas de eliminação adequadas (> 80 %) de COD ou CQO e à produção de efluentes nitrificados. Se a taxa de eliminação for insuficiente, ou se pretender simular o desempenho de uma determinada estação de tratamento, o caudal deve ser alterado. Neste caso, ajustar o caudal de adição do meio orgânico até o desempenho do reator ser equivalente ao da estação de tratamento.

▼M4

Inoculação

35. Se forem utilizadas águas residuais sintéticas, a inoculação proprocionada pelo ar ambiente pode ser bastante para iniciar a proliferação dos microrganismos; se tal não for o caso, adicionar 1 ml/l de águas residuais decantadas à fonte de alimentação, durante 3 dias.

Medições

36. Verificar regularmente se os caudais e as velocidades de rotação se encontram dentro dos limites requeridos. Determinar também o pH do efluente, em especial se for previsível a ocorrência de nitrificação.

Amostragem e análise

37. O método, os padrões e a frequência da amostragem são escolhidos de acordo com o objetivo do ensaio. Colher, por exemplo, amostras pontuais do afluente e do efluente, ou colher amostras durante um período mais longo, por exemplo, 3-6 h. No primeiro período (sem o produto químico em estudo), colher amostras duas vezes por semana. Filtrar as amostras com membranas ou centrifugar a cerca de 40 000 m/s^2 durante cerca de 15 minutos (ponto 18). Pode ser necessário decantar as amostras e/ou filtrá-las com um filtro grosseiro antes da filtração com membrana. Determinar o COD, ou a CQO, pelo menos em duplicado, bem como, se necessário, a CBO, o amónio e os nitritos/nitratos.

38. As análises devem ser efetuadas o mais rapidamente possível após a colheita e a preparação das amostras. Se for necessário adiar a realização das análises, armazenar as amostras a cerca de 4 °C, na obscuridade, em garrafas hermeticamente fechadas. Se as amostras tiverem de ser armazenadas por um período superior a 48 horas, conservá-las por congelação, acidificação ou por adição de uma substância tóxica, por exemplo, 20 ml/l de solução a 10 g/l de cloreto de mercúrio (II). Assegurar que a técnica de conservação não influencia os resultados da análise.

Período de desenvolvimento

39. Neste período, a superfície do biofilme aumenta até atingir uma espessura ótima, o que leva, geralmente, cerca de 2 semanas, não devendo exceder seis semanas. A eliminação de COD ou de CQO (ponto 44) aumenta até atingir um valor estacionário. Quando tiver sido atingida a fase de patamar, registando-se em valor equivalente em ambos os tubos, seleciona-se um destes como testemunha para o resto do ensaio, durante o qual o seu desempenho deverá permanecer constante.

Introdução do produto químico em estudo

40. Adicionar ao outro reator, nesta fase, o produto químico em estudo na concentração requerida, geralmente da ordem de 10-20 mg C/l. O reator de controlo continua a processar apenas o meio orgânico.

Período de aclimatação

41. Continuar a realizar duas vezes por semana a análise do COD ou da CQO; caso se pretenda avaliar a biodegradabilidade primária, medir também a concentração do produto químico em estudo através de um método de análise específico. Prever de uma a seis semanas (ou, em condições especiais, um período mais longo) para a aclimatação, na sequência da introdução do produto químico em estudo. Quando a percentagem de remoção (pontos 43-45) atingir um valor máximo, obter 12-15 valores válidos na fase de patamar durante cerca de três semanas, para avaliação da percentagem de remoção média. Considera-se o ensaio concluído quando for obtido um nível de eliminação suficientemente elevado. A duração do ensaio não deve, em geral, exceder 12 semanas após a adição do produto químico em estudo.

▼M4

Eliminação de crostas do filme

42. A eliminação súbita de grandes quantidades de filme em excesso dos tubos (crostas) ocorre a intervalos relativamente regulares. Para garantir que a comparabilidade dos resultados não é afetada, os ensaios devem abranger, pelo menos, dois ciclos completos de cultura e eliminação de crostas.

DADOS E RELATÓRIOS

Tratamento dos resultados

43. Calcular a percentagem de remoção do prpoduto químico em estudo, em termos de COD ou de CQO, para cada avaliação programada, por recurso à equação:

$$D_t = 100\ [C_s - (E - E_o)]/C_s\%$$

em que

D_t = % de eliminação do COD ou da CQO no instante *t*

Cs = concentração de DOC (ou COD) no afluente devida ao produto químico em estudo, estimada, de preferência, a partir da concentração, em mg/l, da solução-mãe e do volume desta adicionado;

E = valor medido de COD ou CQO no efluente em estudo, no instante *t* (mg/l)

Eo = valor medido de COD ou CQO no efluente em estudo, no instante *t* (mg/l)

Repetir o cálculo para a substância de referência, se tiver sido utilizada.

Desempenho do reator-testemunha

44. O grau de eliminação (D_B) de COD ou de CQO do meio orgânico da unidade de controlo é uma informação útil para avaliar a atividade de biodegradação do biofilme durante o ensaio. Calcular a percentagem de eliminação por recurso à equação:

$$D_B = 100\ (1 - E_o/C_m)\%$$

em que

Cm = COD ou CQO do meio orgânico no afluente de controlo (mg/l)

45. Calcular a remoção (D_{ST}) do produto químico em estudo, se determinada por um método analítico específico, em cada instante, com base na equação:

$$DST = 100\ (1 - S_e/S_i)\%$$

em que

S_i = concentração medida ou (de preferência) estimada do produto químico em estudo no afluente (mg/l)

S_e = concentração medida ou estimada do produto químico em estudo no efluente, no instante *t* (mg/l)

▼M4

Se o método de análise conduzir a um valor positivo nas lamas inalteradas, equivalente a S_e mg/l, calcular a percentagem de eliminação (D_{SC}) com base na seguinte equação:

$$DSC = 100\ (S_i - S_e + S_c)/(S_i + S_c)\ \%$$

Apresentação dos resultados do ensaio

46. Traçar o gráfico da percentagem de eliminação, D_t (ou D_{SC}) e D_{ST}, se for o caso, em função do tempo (ver o capítulo C.10-A, apêndice 2). Considerar a média (arredondada ao número inteiro mais próximo) e o desvio-padrão dos valores dos 12-15 valores de D_T (e de D_{ST}, se disponíveis) obtidos na fase de patamar como a percentagem de remoção do produto químico em estudo. A forma da curva de eliminação permite tirar algumas conclusões quanto aos processos de remoção.

Adsorção

47. Caso se observe uma elevada remoção de COD do produto químico em estudo no início do ensaio, o produto em causa é, provavelmente, removido por adsorção no biofilme. Esta suposição pode ser comprovada determinando a quantidade de produto adsorvido nos sólidos removidos do filme. Não é comum que a eliminação do COD das substâncias adsorvíveis permaneça elevada ao longo do ensaio; em geral, observa-se um elevado grau de eliminação no início, que baixa progressivamente para um valor de equilíbrio. Contudo, se a substância em estudo adsorvida tiver causado a aclimatação da flora microbiana, a eliminação do seu COD poderá aumentar posteriormente, estabilizando-se em valores elevados.

Fase de latência

48. Muitos produtos químicos em estudo passam por uma fase de latência, antes de ocorrer a biodegradação completa, nomeadamente nos ensaios estáticos de rastreio. Na fase de latência, ocorre a aclimatação ou adaptação das bactérias responsáveis pela degradação, não se observando praticamente qualquer remoção do produto; a proliferação das bactérias inicia-se em seguida. Esta fase termina, considerando-se que se inicia a fase de degradação, quando for removida cerca de 10 % da quantidade inicial de produto químico em estudo (após a adsorção, caso ocorra). Em geral, a fase de latência é muito variável e pouco reprodutível.

Fase de patamar

49. A fase de patamar da curva de eliminação de um ensaio contínuo é definida como a fase em que ocorre a degradação máxima. Deve durar, pelo menos, 3 semanas, durante as quais se devem determinar cerca de 12-15 valores válidos.

Grau de remoção médio do produto químico em estudo

50. Calcular o valor médio a partir dos valores de eliminação (D_t e D_{st}, se disponível) obtidos para o produto químico em estudo na fase de patamar. O grau de remoção do produto químico em estudo é arredondado ao número inteiro mais próximo (1 %). Recomenda-se também o cálculo do intervalo de confiança de 95 % do valor médio. Calcular do mesmo modo o grau médio (D_B) de eliminação do meio orgânico no recipiente de controlo.

▼M4

Indicação da biodegradação

51. Se o produto químico em estudo não for adsorvido de forma significativa pelo biofilme e a curva de eliminação tiver a forma característica de uma curva de biodegradação com fases de latência, degradação e patamar (pontos 48 e 49), a eliminação determinada pode ser atribuída com segurança à biodegradação. Se ocorrer uma elevada remoção inicial, o ensaio de simulação não permite distinguir os processos de eliminação biológicos dos abióticos. Nesses casos, e noutros casos em que existam dúvidas quanto a biodegradação (por exemplo, se ocorrer separação), analisar o produto químico em estudo adsorvido em amostras do filme ou efetuar mais ensaios estáticos de rastreio da biodegradabilidade com base em parâmetros que comprovem claramente os processos biológicos. Esses ensaios devem consistir em métodos baseados no consumo de oxigénio (capítulo C.4 do presente anexo D, E e F) (9) ou num teste que meça a produção de CO_2 (capítulo C.4-C do presente anexo, ou o método *headspace*) (10); utilizar como inóculo biofilme pré-exposto proveniente do reator adequado.

52. Se tiverem sido determinadas a remoção do COD e a eliminação de substâncias específicas, a ocorrência de diferenças significativas entre as percentagens (primeiro valor superior ao segundo) indicam a presença nos efluentes de substâncias orgânicas intermediárias cuja degradação pode ser mais difícil. Estas substâncias devem ser objeto de investigação.

Validade dos resultados

53. Considerar o ensaio válido se o grau de eliminação do COD (ou de CQO) (D_B) nas unidades de controlo for superior a 80 % após 2 semanas de funcionamento sem se observarem ocorrências relevantes.

54. Se a substância de referência utilizada apresentar uma biodegradabilidade "fácil", o grau de biodegradação deve ser > 90 % e a diferença entre os duplicados não deve exceder 5 %. Caso estes dois critérios não sejam satisfeitos, rever os procedimentos experimentais e/ou utilizar águas residuais domésticas de outra origem.

55. Do mesmo modo, as diferenças entre os valores de biodegradação das unidades em duplicado (se utilizadas) que processem um produto químico em estudo não devem divergir em mais de 5 %. Se este critério não for respeitado, mas a eliminação permanecer elevada, prosseguir a análise por um período de mais três semanas. Se a eliminação for baixa, investigar os efeitos inibidores do produto químico em estudo, caso não sejam conhecidos, e repetir o ensaio com uma concentração inferior do produto, se possível.

Relatório do ensaio

56. O relatório do ensaio deve incluir as seguintes informações:

Produto químico em estudo:

— dados de identificação,

— natureza física e, quando pertinente, propriedades físico-químicas.

Condições de ensaio:

— quaisquer alterações ao sistema de ensaio, especialmente se forem utilizadas frações insolúveis ou voláteis,

— tipo de meio orgânico,

— proporção e natureza das eventuais águas residuais provenientes de indústrias, se conhecidas,

— método de inoculação,

▼M4

— solução-mãe do produto químico em estudo — COD (carbono orgânico dissolvido) e COT (carbono orgânico total); forma de preparação, caso se trate de uma suspensão; concentração(ões) de ensaio utilizada(s), justificando eventuais desvios em relação à gama 10-20 mg/l de COD; método de adição; data da primeira adição; quaisquer alterações da concentração,

— tempo médio de retenção hidráulica (sem proliferação); velocidade de rotação do tubo; ângulo de inclinação aproximado, se possível,

— pormenores sobre formação de crostas; tempo e intensidade,

— temperatura, ou gama de temperaturas, de ensaio,

— técnicas de análise utilizadas.

Resultados do ensaio:

— todos os valores medidos (COD, CQO, análises específicas, pH, temperatura, substâncias azotadas, se for caso disso),

— todos os valores calculados dos parâmetros D_t (ou D_{tc}), D_B, D_{St}, na forma de quadro e a partir das curvas de eliminação,

— informações sobre as fases de latência e de patamar, a duração do ensaio, o grau de eliminação do produto químico em estudo, da substância de referência (se utilizada) e do meio orgânico na unidade de controlo, juntamente com dados estatísticos e conclusões sobre a biodegradabilidade e a validade do ensaio,

— discussão dos resultados.

REFERÊNCIAS:

(1) Gerike P., Fischer W., Holtmann W. (1980): Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD Confirmatory Test. *Wat. Res*. 14: 753-758.

(2) Truesdale G.A., Jones K., Vandyke K.G. (1959): Removal of synthetic detergents in sewage treatment proccesses: Trials of a new biologically attackable material.*Wat. Waste Tr. J*. 7: 441-444.

(3) Baumann U., Kuhn G., Benz M. (1998): Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, UWSF - *Z. Umweltchem. Ökotox.* 10: 214-220.

(4) Gloyna E.F., Comstock R.F., Renn C.E. (1952): Rotary tubes as experimental trickling filters. Sewage ind. Waste 24: 1355-1357.

(5) Kumke G.W., Renn C.E. (1966). LAS removal across an institutional trickling filter. JAOCS 43: 92-94.

(6) Tomlinson T.G., Snaddon D.H.M. (1966): Biological oxidation of sewage by films of micro-organisms. *Int.J. Air Wat. Pollut*. 10: 865-881.

(7) Her Majesty's Stationery Office (1982): Methods for the examination of waters and associated materials. Assessment of biodegradability, 1981, Londres.

(8) Her Majesty's Stationery Office (1984): Methods for the examination of waters and associated materials. Methods for assessing the treatability of chemicals and industrial waste waters and their toxicity to sewage treatment processes, 1982, Londres.

(9) Capítulo C.4 deste anexo: "Determinação da Biodegradabilidade 'Fácil', A-F".

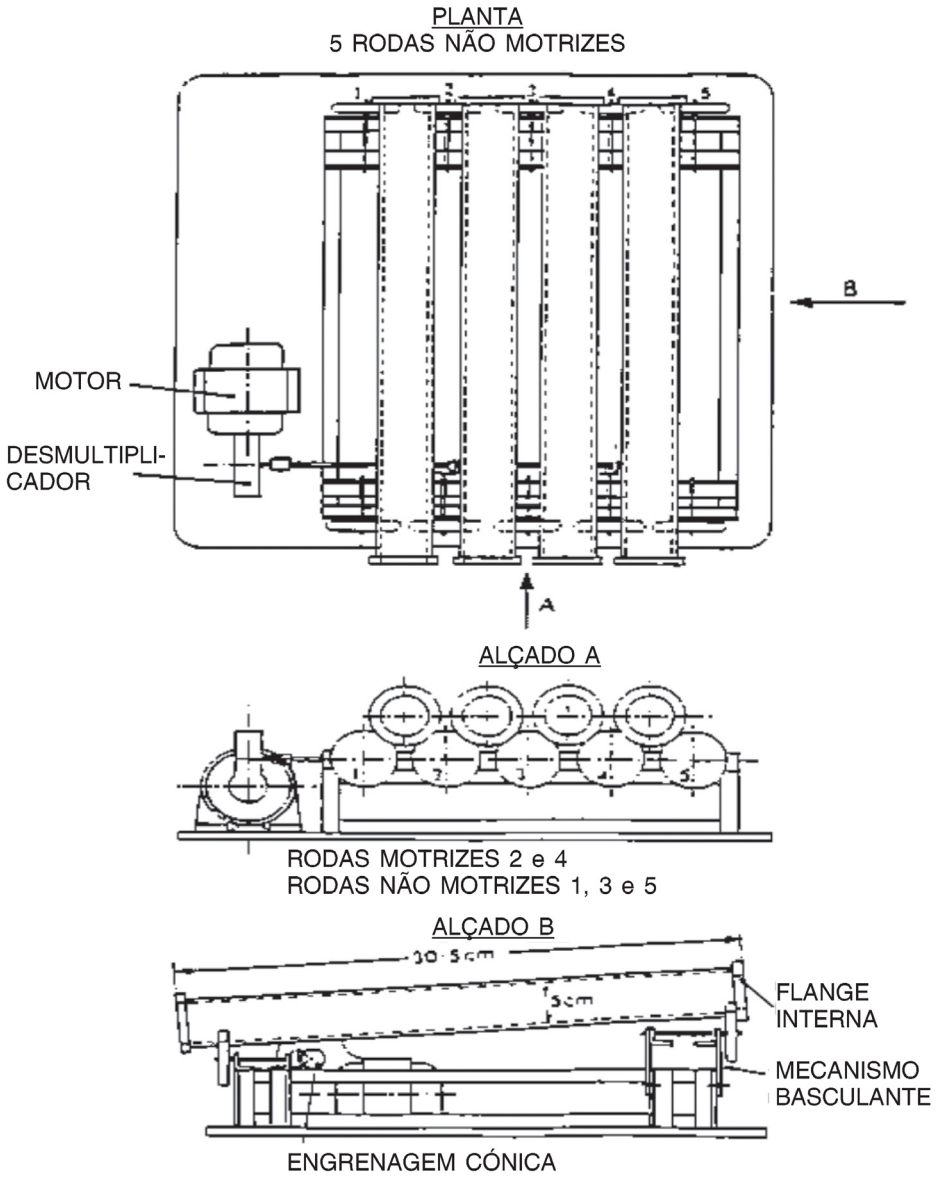
(10) ISO 14593 (1998). Water Quality-Evaluation in an aqueous medium of the ultimate biodegradability of organic substances. Method by analysis of released inorganic carbon in sealed vessels.

▼**M4**

Apêndice 8

Figura 1

Tubos rotativos



Glossário:

planta

alçado A/B

rodas motrizes

rodas não motrizes

motor

desmultiplicador

flange interna

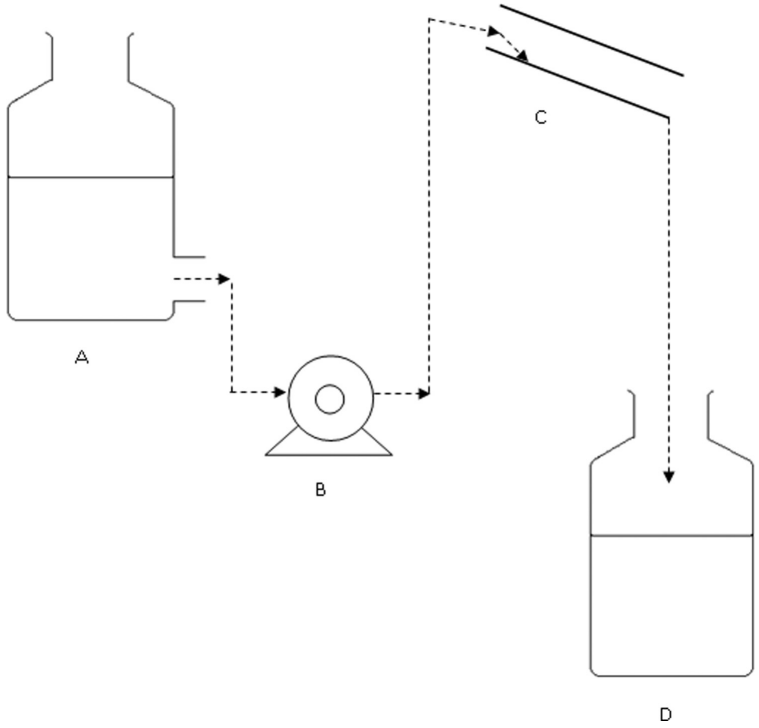
mecanismo basculante

engrenagem cónica

▼**M4**

Figura 2

Diagrama das operações



A: Tanque de alimentação

B: Bomba peristáltica

C: Tubo rotativo

D: Recipiente de recolha do efluente

DEFINIÇÕES

Substância em estudo: qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado o presente método de ensaio.

Produtos químicos: De notar que o termo "*chemical*", amplamente utilizado nos acordos UNCED e documentos posteriores, abrange substâncias, produtos, misturas, preparações ou quaisquer outros termos utilizados em sistemas existentes para denotar abrangência.

▼M6

C.11. LAMAS ATIVADAS — ENSAIO DE INIBIÇÃO DA RESPIRAÇÃO (OXIDAÇÃO DO CARBONO E DO AMÓNIO)

INTRODUÇÃO

1. Este método é equivalente ao *Test Guideline* TG 209 (2010) da OCDE. Visa determinar os efeitos de um produto químico sobre microrganismos de lamas ativadas (principalmente bactérias), medindo a taxa respiratória (oxidação de carbono e/ou amónio) em determinadas condições, com diferentes concentrações do produto químico em estudo. O método baseia-se no ensaio da ETAD (*Ecological and Toxicological Association of the Dyestuffs Manufacturing Industry*) (1) (2), no anterior *Test Guideline* TG 209 da OCDE (3) e na norma revista ISO 8192 (4). O objetivo do ensaio consiste em proporcionar um processo rápido de avaliação dos efeitos dos produtos químicos nos microrganismos das lamas ativadas do estágio biológico (aeróbio) das estações de tratamento de águas residuais. Os resultados do ensaio podem também servir de indicadores das concentrações adequadas sem inibição dos produtos químicos em estudo a utilizar nos ensaios de biodegradação (por exemplo, capítulos C.4 A-F, C.9, C.10, C.12 e C.29 do presente anexo; OCDE TG 302C). Neste caso, o ensaio pode ser executado como ensaio de pesquisa preliminar, à maneira de um ensaio de determinação da gama de concentrações ou de um ensaio do limite (ver ponto 39), visando apenas a respiração em geral. Esses dados devem, contudo, ser ponderados com cuidado no caso dos ensaios de biodegradabilidade imediata (capítulos C.4 A-F e C. 29 do presente anexo), em que a concentração do inóculo é significativamente mais baixa do que a utilizada no presente método de ensaio. Com efeito, a ausência de inibição respiratória no presente ensaio não pressupõe automaticamente a existência de condições de não-inibição no ensaio de biodegradabilidade rápida descrito nos capítulos C.4, A-F, ou C.29 do presente anexo.

2. De um modo geral, os ensaios de inibição da respiração parecem ter sido aplicados com êxito desde que foram descritos pela primeira vez, embora, em certos casos, tenham sido comunicados resultados espúrios — ver, por exemplo, (2) (4) (5). Por vezes, as curvas respiração *versus* concentração são bifásicas, as curvas dose-resposta distorcidas e os valores de EC_{50} anormalmente baixos (5). De acordo com as pesquisas efetuadas, esses resultados são obtidos quando as lamas ativadas utilizadas no ensaio exibem uma nitrificação significativa e o produto químico em estudo tem maior efeito na oxidação do amónio do que na oxidação heterotrófica em geral. Por conseguinte, tais resultados espúrios podem ser corrigidos através da realização de ensaios complementares com recurso a um inibidor específico da nitrificação. Medindo as taxas de consumo de oxigénio na presença e na ausência de um inibidor, como, por exemplo, a *N*-aliltioureia (ATU), é possível calcular separadamente as taxas de absorção de oxigénio total, heterotrófica e de nitrificação (4) (7) (8). Podem assim determinar-se os efeitos inibidores do produto químico em estudo em ambos os processos, sendo os valores de EC_{50}, tanto para a oxidação do carbono orgânico (heterotrófica) como do amónio (nitrificação), calculados da forma habitual. De notar que, em alguns casos raros, o efeito inibidor da *N*-aliltioureia pode ser parcial ou totalmente suprimido por complexação da mesma com produtos químicos ou suplementos do meio, como, por exemplo, iões Cu^{++} (6). Os iões Cu^{++} são essenciais para as *Nitrosomonas*, embora sejam tóxicos em concentrações mais elevadas.

3. A necessidade de nitrificação no tratamento aeróbio de águas residuais, que se considera um passo necessário no processo de eliminação do azoto proveniente das mesmas por desnitrificação de forma a obter produtos gasosos, tornou-se particularmente urgente nos países europeus; a UE dispõe agora de limites mais baixos de concentração de azoto nos efluentes descarregados para águas recetoras ([1]).

([1]) Diretiva 91/271/CEE do Conselho, de 21 de maio de 1991, relativa ao tratamento de águas residuais urbanas (JO L 135 de 30.5.1991, p. 40).

▼**M6**

4. Na maioria dos casos, o método para avaliar o efeito nos processos de oxidação do carbono orgânico é, por si só, suficiente. Contudo, para a interpretação dos resultados e a compreensão dos efeitos, é necessário, em alguns casos, um exame do efeito apenas na nitrificação ou, separadamente, nesta e na oxidação do carbono orgânico.

PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

5. As taxas de respiração de amostras de lamas ativadas alimentadas com águas residuais sintéticas são medidas, com um elétrodo de oxigénio, em células fechadas, após um tempo de contacto de 3 horas. Num cenário de exposição realista, podem justificar-se períodos de contacto mais longos. Se o produto químico em estudo for rapidamente degradado (por exemplo, por hidrólise abiótica) ou for volátil e a concentração não puder ser mantida de forma adequada, pode recorrer-se a um período de exposição suplementar mais curto: por exemplo, de 30 minutos. No dia da exposição, a sensibilidade de cada lote de lamas ativadas deve ser verificada com um produto químico de referência adequado. O ensaio é geralmente utilizado para determinar o parâmetro EC_x (por exemplo, EC_{50}) e/ou a concentração sem efeitos observáveis (NOEC) do produto químico em estudo.

6. A inibição do consumo de oxigénio pelos microrganismos que oxidam carbono orgânico pode ser expressa separadamente da inibição por microrganismos que oxidam amónio, medindo as taxas de absorção de oxigénio na ausência e na presença de *N*-aliltioureia, inibidor da oxidação de amónio a nitrito pelas bactérias nitrificantes, numa primeira fase. Neste caso, a inibição percentual da taxa de consumo de oxigénio é calculada por comparação entre a taxa de consumo de oxigénio na presença de um produto químico e a taxa média de consumo de oxigénio dos controlos correspondentes sem o produto químico em estudo, na presença e na ausência do inibidor específico (*N*-aliltioureia).

7. O eventual consumo de oxigénio decorrente de processos abióticos pode ser detetado por determinação da taxa de consumo em misturas do produto químico em estudo com meio residual sintético e água (suprimindo as lamas ativadas).

INFORMAÇÕES SOBRE O PRODUTO QUÍMICO EM ESTUDO

8. A fim de permitir uma interpretação correta dos resultados, devem ser conhecidas a identidade (de preferência, o número CAS), o nome (de acordo com as regras da IUPAC), a pureza, a hidrossolubilidade, a pressão de vapor, a volatilidade e as características de adsorção do produto químico em estudo. Em geral, o ensaio não pode ser aplicado com razoabilidade a produtos químicos voláteis, salvo se se tomarem precauções especiais (ver ponto 21).

APLICABILIDADE DO MÉTODO DE ENSAIO

9. O método de ensaio é aplicável a produtos químicos solúveis e pouco solúveis em água, bem como a produtos químicos voláteis. Contudo, nem sempre será possível obter valores de EC_{50} no caso de produtos químicos com solubilidade reduzida; por outro lado, só será possível obter resultados válidos com produtos químicos voláteis se a maior parte (por exemplo, > 80 %) do produto em causa permanecer na mistura reacional no termo do(s) período(s) de exposição. Se houver incerteza sobre a estabilidade ou a volatilidade do produto químico em estudo, é necessário fornecer dados analíticos suplementares que permitam estabelecer a concentração correspondente a EC_x.

▼M6

PRODUTOS QUÍMICOS DE REFERÊNCIA

10. Os produtos químicos de referência devem ser ensaiados periodicamente, de forma a garantir a fiabilidade do método e das condições de ensaio e a verificar a sensibilidade de cada lote de lamas ativadas utilizadas como inóculo microbiano no dia da exposição. Recomenda-se a utilização de 3,5-diclorofenol (3,5-DCP) como substância inibidora de referência, dado que é um conhecido inibidor da respiração e é utilizado em vários tipos de ensaios de inibição/toxicidade (4). O sulfato de cobre (II) penta-hidratado pode também ser utilizado como substância de referência para a inibição da respiração total (9). A *N*-metilanilina pode ser utilizada como inibidor de referência específico da nitrificação (4).

CRITÉRIOS DE VALIDADE E DE REPRODUTIBILIDADE

11. Nos ensaios em branco (sem o produto químico em estudo nem o produto químico de referência), a taxa de consumo de oxigénio por hora não deve ser inferior a 20 mg de oxigénio por 1 grama de lama ativada (peso seco dos sólidos em suspensão). Se a taxa for inferior, deve repetir-se o ensaio com lamas ativadas lavadas ou com lamas de outra proveniência. O coeficiente de variação da absorção de oxigénio nos replicados de controlo não deve ser superior a 30 %, no final do ensaio definitivo.

12. Em 2004, num estudo interlaboratorial comparativo organizado pela ISO (4), que utilizou lamas ativadas provenientes de efluentes domésticos, verificou-se que a EC_{50} do 3,5-DCP se situa na gama de 2 mg/l a 25 mg/l no caso da respiração total, 5 mg/l a 40 mg/l no caso da respiração heterotrófica e 0,1 mg/l a 10 mg/l no caso da respiração com nitrificação. Se a EC_{50} do 3,5-DCP não se situar no intervalo previsto, o ensaio deve ser repetido com lamas ativadas de outra proveniência. A EC_{50} do sulfato de cobre (II) penta-hidratado deve situar-se na gama de 53-155 mg/l no caso da respiração total (9).

DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

Recipientes e aparelhos

13. Deve utilizar-se material corrente de laboratório, nomeadamente o seguinte:

a) Recipientes de ensaio — por exemplo, frascos de 1 000 ml contendo 500 ml de mistura de reação (ver elemento 5 da figura 1);

b) Célula e dispositivos afins para medir a concentração de oxigénio dissolvido; elétrodo de oxigénio adequado; célula para inserir a amostra sem espaço livre, munida de um registador (por exemplo, elementos 7, 8 e 9 da figura 1, no apêndice 2); em alternativa, pode utilizar-se uma garrafa de CBO com um adaptador de manga adequado para fixar o elétrodo de oxigénio no gargalo (ver figura 2, no apêndice 3). Para evitar perdas de líquido com a inserção do elétrodo de oxigénio, é conveniente começar por inserir na manga um funil ou tubo de vidro ou utilizar recipientes munidos de mangas com rebordo. Em ambos os casos, deve utilizar-se um agitador magnético ou um método de agitação alternativo, como, por exemplo, uma sonda autoagitadora;

c) Agitador e barras magnéticas revestidas de um material inerte, para utilização na câmara de medição e/ou nos recipientes de ensaio;

d) Dispositivo de arejamento: Se necessário, o ar comprimido deve passar por um filtro adequado à remoção de poeiras e óleos, bem como por frascos de lavagem com água, para a humidificação do ar. O conteúdo

▼M6

dos recipientes deve ser arejado com pipetas de Pasteur ou outros dispositivos de arejamento que não adsorvam produtos químicos. No caso de produtos químicos que produzam espumas em excesso e de produtos químicos voláteis (que, por conseguinte, se perdem) ou sejam difíceis de dispersar no ar de aspersão, pode utilizar-se um agitador orbital com velocidades da ordem de 150 a 250 rotações/minuto e balões de, por exemplo, 2 000 ml de capacidade, para suprir o consumo de oxigénio das lamas e ultrapassar eventuais dificuldades. Em geral, o sistema de ensaio é constituído por vários recipientes arejados em permanência, dispostos de forma sequencial (por exemplo, com intervalos de cerca de 10 a 15 minutos), sujeitos a análise sequencial. Em misturas, podem também utilizar-se instrumentos validados que permitam, de forma simultânea, o arejamento e a medição da taxa de consumo de oxigénio;

e) Medidor de pH;

f) Centrifugadora (em geral, centrifugadora de bancada para lamas, para funcionamento a 10 000 m/s^2).

Reagentes

14. Devem utilizar-se reagentes de qualidade analítica em todo o processo.

Água

15. Deve utilizar-se água destilada ou desionizada com menos de 1 mg/l de COD, exceto se as especificações estipularem o uso de água da torneira isenta de cloro.

Águas residuais sintéticas

16. O meio deve ser preparado de forma a conter os seguintes componentes, nas quantidades referidas:

— Peptona	16 g
— Extrato de carne ou extrato vegetal comparável	11 g
— Ureia	3 g
— Cloreto de sódio (NaCl)	0,7 g
— Cloreto de cálcio di-hidratado ($CaC1_2$, $2H_2O$)	0,4 g
— Sulfato de magnésio hepta-hidratado ($MgSO_4$, $7H_2O$)	0,2 g
— Mono-hidrogenofosfato de potássio anidro (K_2HPO_4)	2,8 g
— Água destilada ou desionizada para 1 litro	

17. O pH desta solução deve ser de 7,5 ± 0,5. Se o meio que se preparou não for utilizado imediatamente, deve ser guardado em condições de obscuridade, à temperatura de 0 °C a 4 °C, por um período máximo de uma semana ou em condições em que não se verifique qualquer alteração da sua composição. De notar que esta água residual sintética é 100 vezes mais concentrada do que a descrita no relatório técnico da OCDE «Método proposto para a determinação da biodegradação dos agentes tensioativos utilizados nos detergentes sintéticos», de 11 de junho de 1976, com a adição de hidrogenofosfato de dipotássio.

▼M6

18. Em alternativa, os componentes do meio de cultura podem ser esterilizados individualmente antes da armazenagem, podendo também adicionar-se a peptona e o extrato de carne pouco antes de iniciar o ensaio. Antes da utilização, o meio deve ser homogeneizado e o pH ajustado, se necessário, para 7,5 ± 0,5.

Produto químico em estudo

19. No caso de produtos químicos facilmente solúveis em água, a solução de reserva deve ser preparada em concentrações que não excedam o limite de solubilidade na água (não é admissível a formação de precipitados). Os produtos fracamente solúveis em água, as misturas de componentes com solubilidades em água diversas e os produtos que sofram adsorção devem ser pesados e transferidos diretamente para os recipientes de ensaio. Nestes casos, a utilização de soluções de reserva pode ser uma alternativa se as concentrações dos produtos químicos em estudo dissolvidos forem determinadas analiticamente nos recipientes de ensaio antes da adição das lamas ativadas. Se se recorrer ao método WAF (*Water Accommodated Fractions*), é também essencial proceder a uma determinação analítica das concentrações dos produtos químicos em estudo dissolvidos, nos recipientes de ensaio. Deve evitar-se o recurso a solventes orgânicos, dispersantes ou emulsionantes para melhorar a solubilidade. As soluções de reserva e suspensões que ainda não tenham sofrido agitação podem ser ultrassonorizadas (por exemplo, de um dia para o outro), se existirem dados adequados que confirmem a estabilidade do produto químico em estudo nessas condições.

20. O produto químico em estudo pode afetar adversamente o pH no sistema de ensaio. O pH das misturas com o produto químico em estudo deve ser determinado antes da montagem do ensaio, num ensaio preliminar, a fim de apurar se será necessário um ajustamento do pH antes do ensaio principal, e, novamente, no dia da realização do ensaio propriamente dito. Se necessário, as soluções ou suspensões do produto químico em água devem ser neutralizadas antes da adição do inóculo. Contudo, uma vez que a neutralização pode alterar as propriedades químicas do produto, podem realizar-se, consoante a finalidade do estudo, ensaios complementares para avaliar o efeito do produto químico em estudo nas lamas, sem ajustamento do pH.

21. Os efeitos tóxicos dos produtos químicos voláteis, especialmente nos ensaios em que se faz borbulhar ar no sistema, podem exibir uma grande variabilidade devido a perdas da substância durante o período de exposição. Há que tomar os devidos cuidados com essas substâncias, realizando determinações analíticas das mesmas nas misturas de controlo que as contenham e alterando o regime de arejamento.

Produto químico de referência

22. Se for utilizado como produto químico de referência o 3,5-diclorofenol, deve preparar-se uma solução de 1,00 g deste em 1 000 ml de água (15). Deve recorrer-se a água quente e/ou a dispersão ultrassónica para acelerar a dissolução e completar o volume após o arrefecimento à temperatura ambiente. No entanto, é preciso garantir que o produto químico de referência não sofre modificações estruturais. O pH da solução deve ser controlado e, se necessário, ajustado para 7-8, com NaOH ou H_2SO_4.

23. Caso se utilize sulfato de cobre (II) penta-hidratado como produto químico de referência, devem preparar-se concentrações de 58 mg/l, 100 mg/l e 180 mg/l (fator de 1,8). O produto é pesado diretamente para os recipientes de ensaio (29-50-90 mg para 500 ml de volume total). Dissolve-se, então, em 234 ml de água da torneira esterilizada em autoclave. O sulfato de cobre (II) penta-hidratado é facilmente solúvel. Ao iniciar o ensaio, adicionam-se 16 ml de águas residuais sintéticas e 250 ml de lamas ativadas.

▼M6

Inibidor específico da nitrificação

24. Preparar uma solução de reserva de 2,32 g/l de *N*-aliltioureia (ATU). A adição de 2,5 ml desta solução a uma mistura de incubação de volume final 500 ml conduz a uma concentração final de 11,6 mg ATU/l (10^{-4} mol/l), que se sabe (4) ser suficiente para causar 100 % de inibição da nitrificação em lamas ativadas com 1,5 g/l de sólidos em suspensão.

Controlo abiótico

25. Em certas condições excecionais, os produtos químicos em estudo com propriedades fortemente redutoras podem causar um consumo mensurável de oxigénio abiótico. Nesses casos, são necessários controlos abióticos para que o consumo abiótico de oxigénio pelo produto químico em estudo possa ser distinguido do consumo devido à respiração microbiana. Os controlos abióticos são preparados omitindo o inóculo nas misturas para ensaio. Podem também realizar-se controlos abióticos sem inóculo em apoio de determinações analíticas destinadas a determinar a concentração atingida durante a fase de exposição do ensaio (por exemplo, quando se utilizam soluções de reserva de produtos químicos fracamente solúveis em água cujos componentes tenham solubilidades diferentes na água). Em certos casos específicos, poderá ser necessário preparar um controlo abiótico com inóculo esterilizado (por exemplo, por esterilização em autoclave ou adição de substâncias tóxicas esterilizantes). Alguns produtos químicos podem produzir ou consumir oxigénio apenas se a área da superfície for suficiente para que ocorra a reação, mesmo que, em geral, necessitem de uma temperatura ou pressão muito mais elevada para tal. Neste contexto, importa dar especial atenção aos peróxidos. Um inóculo esterilizado proporciona uma grande superfície.

Inóculo

26. As lamas ativadas para utilização geral devem ser recolhidas à saída, ou junto da saída, do tanque de arejamento de uma estação de tratamento de águas residuais com funcionamento adequado que processe predominantemente esgotos domésticos. Consoante a finalidade do ensaio, podem utilizar-se outros tipos de fontes de lamas ativadas, como, por exemplo, lamas cultivadas em laboratório, com concentrações adequadas de sólidos em suspensão (2 g/l a 4 g/l). Contudo, lamas provenientes de instalações de tratamento de águas residuais diferentes podem apresentar características e sensibilidades diversas.

27. As lamas podem ser utilizadas na forma em que são recolhidas, mas as partículas grosseiras devem ser removidas por sedimentação durante um curto período (por exemplo, de 5 a 15 minutos), seguida de decantação do sobrenadante — que contém os sólidos mais finos — ou de peneiração (por exemplo, com poros de 1 mm^2). Em alternativa, as lamas podem ser homogeneizadas num misturador durante cerca de 15 segundos ou por um período mais longo, mas deve ter-se em conta a força transversal e a variação de temperatura que podem registar-se no caso de períodos de mistura longos.

28. A lavagem das lamas é frequentemente necessária (por exemplo, se a taxa de respiração endógena for baixa). As lamas devem começar por ser centrifugadas por um certo período, até produzirem um sobrenadante claro e um aglomerado de sólidos (por exemplo, 10 minutos a cerca de 10 000 m/s^2). O líquido sobrenadante é então rejeitado e as lamas repostas em suspensão em água da torneira isenta de cloro, com agitação, removendo-se de seguida a água de lavagem por recentrifugação e rejeitando-se de novo o sobrenadante. O processo de lavagem e centrifugação deve ser repetido, se necessário. Determina-se a massa seca de um determinado volume de lama ressuspensa e concentra-se a lama por remoção da fase líquida ou diluição com água da torneira isenta de cloro até se obter a concentração pretendida de sólidos nas

▼M6

lamas (3 g/l). As lamas ativadas devem ser arejadas continuamente (por exemplo, a 2 l/minuto) à temperatura de ensaio e, se possível, utilizadas no dia da recolha. Se tal não for possível, as lamas devem ser alimentadas com águas residuais sintéticas (50 ml de água residual sintética por litro de lamas ativadas) durante dois dias suplementares. As lamas são então utilizadas no ensaio e os resultados aceites como válidos, desde que não tenha ocorrido nenhuma alteração significativa da atividade avaliada com base nas taxas de respiração endógena heterotrófica e de nitrificação.

29. Podem surgir dificuldades se ocorrer formação de espuma durante a incubação, dado que a espuma e os sólidos das lamas que esta arrasta são expelidos dos recipientes de arejamento. A formação de espuma pode simplesmente resultar da presença das águas residuais sintéticas, mas é previsível se o produto químico em estudo for, ou contiver, um tensioativo. A perda de lamas sólidas nas misturas de ensaio resultará numa redução artificial das taxas de respiração, que pode ser erroneamente interpretada como decorrente de uma inibição. Além disso, o arejamento da solução de tensioativo concentra-o na camada de espuma; a perda de espuma do sistema de ensaio reduz as concentrações de exposição. A formação de espuma pode ser controlada por métodos puramente mecânicos (por exemplo, agitação manual ocasional com uma vareta de vidro) ou adicionando um agente emulsionante antiespuma de silicone, isento de tensioativos, e/ou recorrendo ao método de arejamento por agitação do frasco. Se o problema decorrer da presença de águas residuais sintéticas, a composição destas deve ser modificada por adição de um reagente antiespuma (por exemplo, 50 µl/l). Se a formação de espuma for atribuível ao produto químico em estudo, a quantidade necessária para a reduzir deve ser determinada à concentração máxima de ensaio e todos os frascos com arejamento devem ser tratados do mesmo modo (inclusive aqueles em que não se observa espuma, como os controlos em branco e os frascos de referência). Se forem utilizados agentes antiespuma, não deve haver interação com o inóculo e/ou o produto químico em estudo.

MÉTODO DE ENSAIO

30. É possível determinar a inibição de três tipos diferentes de consumo de oxigénio (total, heterotrófico e devido à nitrificação). Em geral, é adequada a medição da inibição do consumo total de oxigénio. Os efeitos no consumo heterotrófico de oxigénio decorrentes da oxidação do carbono orgânico presente e da oxidação de amónio devem ser conhecidos, caso exista um requisito específico para estes dois parâmetros no que respeita a um determinado produto químico ou (opcionalmente) para explicar curvas dose-resposta atípicas de inibição do consumo total de oxigénio.

Condições de realização do ensaio

31. O ensaio deve ser realizado a uma temperatura situada na gama 20 ± 2 °C.

Misturas de ensaio

32. Preparam-se misturas de ensaio (F_T, como no quadro 1) constituídas por água, água residual sintética e o produto químico em estudo, de forma a obter diversas concentrações nominais do produto químico em estudo (para exemplos dos volumes de componentes, ver quadro 1). Se necessário, o pH deve ser ajustado para 7,5 ± 0,5; as misturas devem ser diluídas com água, adicionando-se o inóculo de forma a que os volumes finais nos recipientes sejam iguais, iniciando-se então o arejamento.

Misturas de referência

33. As misturas de referência (F_R) devem ser preparadas da mesma forma que as misturas para ensaio, utilizando o produto químico de referência (por exemplo, 3,5-diclorofenol) em vez do produto químico em estudo.

▼M6

Controlos em branco

34. Os controlos em branco (F_B) devem ser preparados no início e no final do período de exposição, sendo os recipientes de ensaio processados a intervalos sequenciais. Nos ensaios efetuados com recurso a equipamentos que permitem a medição simultânea de consumo de oxigénio, cada lote de análises simultâneas deve incluir, pelo menos, dois ensaios em branco. Os ensaios em branco contêm volumes iguais de lamas ativadas e meio sintético mas não o produto químico em estudo ou de referência. Deve efetuar-se a diluição com água para o mesmo volume que no caso das misturas de ensaio e de referência.

Controlo abiótico

35. Caso seja necessário (por exemplo, se se souber ou suspeitar que o produto químico em estudo tem propriedades fortemente redutoras), deve preparar-se uma mistura F_A para medir o consumo de oxigénio abiótico. A mistura deve conter as mesmas quantidades de produto químico em estudo e de água residual sintética e o mesmo volume que as misturas de ensaio, mas sem lamas ativadas.

Procedimento geral de ensaio e medições

36. As misturas de ensaio e de referência, bem como para os ensaios em branco e o controlo abiótico, são incubadas à temperatura de ensaio em condições de arejamento forçado (0,5 a 1 l/min), a fim de manter a concentração de oxigénio dissolvido acima de 60-70 % da concentração de saturação e os flocos das lamas em suspensão. É também necessário agitar as culturas para manter os flocos das lamas em suspensão. Considera-se que a incubação tem início com o contacto inicial do inóculo de lamas ativadas com os outros componentes da mistura final. No final da incubação, decorridos os tempos de exposição especificados, geralmente de 3 horas, retiram-se as amostras para medir a taxa de decréscimo da concentração de oxigénio dissolvido na célula concebida para o efeito (figura 2, no apêndice 3) ou numa garrafa de CBO completamente cheia. As condições em que se inicia a incubação dependem também da capacidade de medição das taxas de consumo de oxigénio do equipamento utilizado. Por exemplo, se este for constituído por uma única sonda de oxigénio, as medições efetuam-se individualmente. Neste caso, preparam-se as várias misturas necessárias para o ensaio com águas residuais sintéticas, mas remove-se o inóculo e introduzem-se em cada recipiente da série as porções necessárias de lamas. As incubações sucessivas devem iniciar-se com intervalos convenientemente espaçados, de, por exemplo, 10 a 15 minutos. Em alternativa, o sistema de medição pode compreender várias sondas que facilitem a realização de várias medições em simultâneo; neste caso, o inóculo pode ser adicionado ao mesmo tempo a grupos adequados de recipientes.

37. A concentração nominal das lamas ativadas em todas as misturas de ensaio, incluindo os ensaios de referência e em branco (mas não o controlo abiótico) é de 1,5 g/l de sólidos suspensos. O consumo de oxigénio deve ser medido após 3 horas de exposição. Nos casos em que tal se justifica, previamente descritos no ponto 5, devem efetuar-se medições após um período de exposição suplementar de 30 minutos.

Potencial de nitrificação das lamas

38. A fim de decidir se as lamas se nitrificam e, em caso afirmativo, a que taxa, devem preparar-se misturas (F_B) tal como no ensaio em branco e misturas de

▼M6

«controlo» adicionais (F_N), que contenham também 11,6 mg/l de *N*-aliltioureia. Estas misturas devem ser arejadas e incubadas a 20 .º ± 2 °C durante 3 horas. Em seguida, medem-se as taxas de consumo de oxigénio e calcula-se a taxa de consumo de oxigénio devido à nitrificação.

Planeamento do ensaio

Ensaio exploratório da gama de concentrações

39. Quando necessário, efetua-se um ensaio preliminar de estimativa da gama de concentrações do produto químico em estudo num ensaio definitivo para a determinação da inibição do consumo de oxigénio. Em alternativa, a ausência de inibição do consumo de oxigénio pelo produto químico em estudo num ensaio preliminar pode demonstrar que é desnecessário realizar o ensaio definitivo, devendo, contudo, efetuar-se um ensaio em triplicado com a maior das concentrações testadas no ensaio preliminar (dependente dos dados que se pretende obter, mas, em geral, de 1 000 mg/l).

Quadro 1

Exemplos de misturas para o ensaio preliminar

Reagente	Concentração inicial				
Solução de reserva do produto químico em estudo	10 g/l				
Solução de reserva de meio sintético	Ver ponto 16				
Suspensão de reserva de lamas ativadas	3 g/l de sólidos suspensos				
Componentes das misturas	Dosagem para os recipientes de ensaio [a]				
	F_{T1}	F_{T2}	F_{T3-5}	F_{B1-2}	F_A
Solução de reserva do produto químico em estudo (ml) (pontos 19 a 21)	0,5	5	50	0	50
Solução de reserva de águas residuais sintéticas (ml) (ponto 16)	16	16	16	16	16
Suspensão de lamas ativadas (ml) (pontos 26 a 29)	250	250	250	250	0
Água (ponto 15)	233,5	229	184	234	434
Volume total das misturas (ml)	500	500	500	500	500
Concentrações na mistura					
Suspensão de ensaio (mg/l) Lamas ativadas	10	10	1 000	0	1 000
(sólidos em suspensão) (mg/l)	1 500	1 500	1 500	1 500	0

[a] Deve adotar-se o mesmo procedimento com o produto químico de referência no que respeita aos frascos F_{R1-3}

40. O ensaio deve ser realizado por recurso a, pelo menos, três concentrações do produto químico em estudo (por exemplo, 10 mg/l, 100 mg/l e 1 000 mg/l), com um controlo em branco e, se necessário, pelo menos três controlos

▼M6

abióticos com a concentração mais elevada do produto químico em estudo (ver exemplos no quadro 1). Idealmente, a concentração mais baixa não deve ter qualquer efeito no consumo de oxigénio. Devem calcular-se as taxas de consumo de oxigénio e a taxa de nitrificação, se pertinente; calcula-se, em seguida, a inibição percentual. Consoante a finalidade do ensaio, é também possível determinar simplesmente a toxicidade de uma concentração-limite (por exemplo, 1 000 mg/l). Se não se verificar qualquer efeito tóxico estatisticamente significativo a essa concentração, não é necessário prosseguir o ensaio com concentrações superiores ou inferiores. De notar que as substâncias fracamente solúveis em água, as misturas de componentes com solubilidades em água diversas e as substâncias que sofram adsorção devem ser pesadas e transferidas diretamente para os recipientes de ensaio. Nesse caso, o volume reservado para a solução de reserva da substância em estudo deve ser substituído por água de diluição.

Ensaio definitivo

Inibição do consumo de oxigénio total

41. O ensaio deve ser efetuado com uma gama de concentrações definidas a partir do ensaio preliminar. Para obter simultaneamente uma NOEC e um valor de EC_x (por exemplo, EC_{50}), recomendam-se, na maioria dos casos, seis concentrações de controlo e cinco concentrações de tratamento, em progressão geométrica, com cinco replicados. O controlo abiótico não necessita de ser repetido se não se observar consumo de oxigénio no ensaio preliminar, mas, se ocorrer uma absorção significativa, devem efetuar-se controlos abióticos para cada concentração do produto químico em estudo. A sensibilidade das lamas deve ser verificada por recurso à substância de referência (3,5-diclorofenol). Deve verificar-se a sensibilidade das lamas para cada série de ensaios, uma vez que é passível de flutuar. Em todos os casos, as amostras são retiradas dos recipientes de ensaio após 3 horas (com 30 minutos suplementares, se necessário), para a medição da taxa de consumo de oxigénio na célula com o elétrodo. As taxas de respiração específicas das misturas de controlo e de ensaio são calculadas a partir dos dados recolhidos; a inibição percentual é calculada de acordo com a equação 7.

Distinção entre a inibição da respiração heterotrófica e a nitrificação

42. A utilização do inibidor específico da nitrificação (ATU) permite avaliar diretamente os efeitos inibidores dos produtos químicos em estudo na oxidação heterotrófica; subtraindo a taxa de consumo de oxigénio na presença de ATU da taxa de absorção total (sem ATU), pode calcular-se o efeito na taxa de nitrificação. Preparam-se duas séries de misturas de reação de acordo com os planos de ensaio para a EC_x ou a NOEC descritos no ponto 41; adiciona-se também ATU a cada mistura de cada série, numa concentração final de 11,6 mg/l, que se verificou inibir totalmente a nitrificação em lamas com concentrações de sólidos suspensos até 3 000 mg/l (4). As taxas de consumo de oxigénio são medidas após o período de exposição; estes valores diretos traduzem apenas a respiração heterotrófica; as diferenças entre eles e as correspondentes taxas de respiração total traduzem a nitrificação. Podem, então, calcular-se os diversos graus de inibição.

Medições

43. Após o período ou os períodos de exposição, transfere-se uma amostra do primeiro recipiente de arejamento para a célula com o elétrodo de oxigénio (figura 1, no apêndice 2) e mede-se de imediato a concentração de oxigénio dissolvido. Se estiver instalado um sistema multielétrodos, as medições podem ser feitas em simultâneo. É fundamental que a agitação (por meio de uma barra magnética) se efetue à mesma velocidade do que aquando da calibração do elétrodo, para assegurar um tempo de resposta mínimo da sonda à evolução das concentrações de oxigénio, bem como para permitir

▼M6

efetuar medições regulares e reprodutíveis de oxigénio no recipiente de medida. Em geral, é adequado o sistema de sonda com autoagitação de alguns elétrodos de oxigénio. Entre as medições, a célula deve ser enxaguada com água. Em alternativa, a amostra pode ser introduzida numa garrafa de CBO (figura 2, no apêndice 3) equipada com agitação magnética. Insere-se uma sonda de oxigénio com um adaptador de manga no gargalo da garrafa e aciona-se o agitador magnético. Em ambos os casos, a concentração de oxigénio dissolvido deve ser medida em contínuo e registada num determinado período, geralmente de 5 a 10 minutos ou até a concentração de oxigénio ser inferior a 2 mg/l. Remove-se o elétrodo, repõe-se a mistura no recipiente de arejamento e prossegue-se o arejamento com agitação, caso seja necessário efetuar medições após um período de exposição mais longo.

Verificação da concentração do produto químico em estudo

44. Para algumas finalidades, pode ser necessário medir a concentração do produto químico em estudo nos recipientes de ensaio. Importa salientar que, se forem utilizadas soluções de reserva de:

— substâncias fracamente solúveis em água,

— misturas com componentes que apresentem solubilidades diferentes na água, ou

— substâncias com boa solubilidade em água e em que a concentração da solução de reserva é próxima da solubilidade máxima na água,

a fração dissolvida é desconhecida, o mesmo sucedendo com a concentração real do produto químico em estudo transferida para os recipientes de ensaio. Para caracterizar a exposição, é necessária uma estimativa analítica das concentrações do produto químico em estudo nos recipientes de ensaio. Por motivos de simplificação, a estimativa analítica deve ser efetuada antes da adição do inóculo. Dado que apenas são transferidas para os recipientes de ensaio as frações dissolvidas, as concentrações medidas podem ser muito baixas.

45. A fim de evitar processos analíticos morosos e dispendiosos, recomenda-se proceder simplesmente à pesagem direta do produto químico em estudo para os recipientes de ensaio e, nos cálculos posteriores, efetuar uma remissão para a concentração nominal correspondente a essa pesagem. Não é necessário diferenciar as frações dissolvida, não dissolvida ou adsorvida do produto químico em estudo porque, em condições reais, todas estas frações ocorrem nas estações de tratamento, variando consoante a composição das águas residuais. O objetivo do método consiste em efetuar uma estimativa realista de uma concentração não-inibitória; o método não é, pois, adequado para investigar em pormenor as frações que contribuem para a inibição dos organismos presentes nas lamas ativadas. Por último, as substâncias adsorvíveis devem ser também pesadas diretamente para os recipientes de ensaio, devendo estes ser untados com silicone, a fim de minimizar as perdas por adsorção.

DADOS E RELATÓRIOS

Cálculo das taxas de consumo de oxigénio

46. As taxas de consumo de oxigénio são calculadas a partir da média dos valores medidos: por exemplo, a partir da porção linear dos gráficos da concentração de oxigénio em função do tempo; os cálculos devem restringir-se às concentrações de oxigénio compreendidas entre 2,0 mg/l e 7,0 mg/l, uma vez que as concentrações mais elevadas e mais baixas podem, por si próprias, influenciar as taxas de consumo. Por vezes, é inevitável e

▼M6

necessário passar para gamas de concentração inferiores ou superiores a estes valores: por exemplo, se a respiração for fortemente inibida e, por conseguinte, se revelar muito lenta, ou se, com uma determinada lama ativada, se observar uma respiração muito rápida. Tal é aceitável se os respetivos troços do gráfico de absorção forem retilíneos e os gradientes não se alterarem para além dos limites de 2,0 mg/l ou 7,0 mg/l de O_2. A ocorrência de secções curvas no gráfico indica uma estabilização do sistema de medição ou uma alteração da taxa de absorção, não devendo essas secções ser utilizadas para o cálculo das taxas de respiração. A taxa de absorção de oxigénio deve ser expressa em miligramas por litro e hora (mg/lh) ou miligramas por grama de lama seca e hora (mg/gh). A taxa de consumo de oxigénio, R, em mg/lh, pode ser calculada ou estimada por interpolação a partir da parte linear do gráfico de redução do oxigénio, de acordo com a equação 1:

$$R = (Q_1 — Q_2)/\Delta_t \times 60 \qquad (1)$$

em que:

Q_1 representa a concentração de oxigénio no início da secção selecionada da fase linear (mg/l);

Q_2 representa a concentração de oxigénio no final da secção selecionada da fase linear (mg/l);

Δ_t representa o intervalo de tempo, em minutos, entre as duas medições.

47. A taxa de respiração específica (R_s) é expressa como a quantidade de oxigénio consumido por grama de peso seco de lamas por hora (mg/gh), de acordo com a equação 2:

$$R_s = R/SS \qquad (2)$$

em que SS representa a concentração de sólidos em suspensão na mistura de ensaio (g/l).

48. Os diversos índices de R que podem ser combinados são os seguintes:

S taxa específica

T taxa de respiração total

N taxa devida à respiração por nitrificação

H taxa devida à respiração heterotrófica

A taxa devida a processos abióticos

B taxa (média) baseada nos ensaios em branco

Cálculo da taxa de consumo de oxigénio por nitrificação

49. A relação entre a respiração total (R_T), a respiração por nitrificação (R_N) e a respiração heterotrófica (R_H) é expressa pela equação 3:

$$R_N = R_T — R_H \qquad (3)$$

em que:

R_N representa a taxa de consumo de oxigénio por nitrificação (mg/lh);

R_T representa a taxa medida de consumo de oxigénio no ensaio em branco (sem ATU; F_B) (mg/lh);

R_H representa a taxa medida de consumo de oxigénio no ensaio em branco com adição de ATU (F_N) (mg/lh).

▼M6

50. Esta relação é válida para os ensaios em branco (R_{NB}, R_{TB}, R_{HB}), os controlos abióticos (R_{NA}, R_{TA}, R_{HA}) e os ensaios com produtos químicos (R_{NS}, R_{TS}, R_{HS}) (mg/gh). As taxas de respiração específicas são calculadas do seguinte modo:

$$R_{NS} = R_N/SS \quad (4)$$

$$R_{TS} = R_T/SS \quad (5)$$

$$R_{HS} = R_H/SS \quad (6)$$

51. Se, num ensaio preliminar, o valor R_N não for significativo (por exemplo, < 5 % do R_T no caso de um ensaio em branco), pode presumir-se que o consumo de oxigénio heterotrófico é igual ao consumo total e que não ocorre nitrificação. Se os ensaios abrangerem os efeitos nos microrganismos heterotróficos e nitrificantes, é necessária uma fonte alternativa de lamas ativadas. Realiza-se um ensaio definitivo se existirem provas da supressão do consumo de oxigénio com diferentes concentrações do produto químico em estudo.

Cálculo da inibição percentual

52. A inibição percentual, I_T, do consumo de oxigénio total para cada concentração do produto químico em estudo é dada pela equação 7:

$$I_T = [1 - (R_T - R_{TA})/R_{TB}] \times 100\ \% \quad (7)$$

53. Do mesmo modo, a inibição percentual, I_H, do consumo de oxigénio heterotrófico para cada concentração do produto químico em estudo é dada pela equação 8:

$$I_H = [1 - (R_H - R_{HA})/R_{HB}] \times 100\ \% \quad (8)$$

54. Por último, a inibição do consumo de oxigénio devida à nitrificação, I_N, para cada concentração do produto químico em estudo é dada pela equação 9:

$$I_N = [1 - (R_T - R_H)/(R_{TB} - R_{HB})] \times 100\ \% \quad (9)$$

55. Representa-se graficamente a inibição percentual do consumo de oxigénio em função do logaritmo da concentração do produto químico em estudo (curva de inibição, ver figura 3, no apêndice 4). São traçadas curvas de inibição para cada período de arejamento de 3 h, eventualmente com 30 minutos adicionais. A concentração de produto químico em estudo que inibe em 50 % a absorção de oxigénio (EC_{50}) é calculada ou estimada por interpolação, a partir do gráfico. Se existirem dados adequados, podem calcular-se ou estimar-se por interpolação os limites de confiança a 95 % do valor de EC_{50}, o declive da curva e os parâmetros adequados que assinalam o início da inibição (por exemplo, EC_{10} ou EC_{20}) e o termo da gama de inibição (por exemplo, EC_{80} ou EC_{90}).

56. Importa salientar que, dada a frequente variabilidade dos resultados, em muitos casos pode bastar exprimi-los por ordem de grandeza. Por exemplo:

EC_{50} < 1 mg/l

EC_{50} 1 mg/l a 10 mg/l

EC_{50} 10 mg/l to 100 mg/l

EC_{50} > 100 mg/l

Interpretação dos resultados

EC_x

▼M6

57. Os valores de EC_x, assim como os correspondentes limites de confiança a 95 % deste parâmetro, são calculados por recurso a métodos estatísticos adequados [análise da função probit, função logística ou de Weibull, método abreviado de Spearman-Karber ou simples interpolação (11)]. Determina-se a EC_x inserindo o valor correspondente a x % da média do grupo de controlo na equação obtida. Para calcular a EC_{50} ou qualquer outra EC_x, procede-se a uma análise de regressão da média das séries (x).

Estimativa da NOEC

58. Caso se pretenda determinar a NOEC por análise estatística, é necessário dispor de dados estatísticos por recipiente (sendo cada recipiente considerado um replicado). Devem utilizar-se métodos estatísticos adequados, de acordo com o documento da OCDE intitulado *Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application* (11). Em geral, investigam-se os efeitos nocivos do produto químico em estudo, comparativamente ao grupo de controlo, testando a hipótese unilateral (mais reduzida) para $p \leq 0,05$.

Relatório do ensaio

59. Elementos a constar do relatório do ensaio:

Produto químico em estudo

— Nome comum, denominação química, número CAS, grau de pureza;

— Propriedades físico-químicas (por exemplo, log K_{ow}, hidrossolubilidade, pressão de vapor, constante de Henry (H) e eventuais informações sobre o destino do produto químico em estudo (por exemplo, absorção pelas lamas ativadas);

Sistema de ensaio

— Origem, condições de funcionamento da estação de tratamento de águas residuais e afluentes que recebe, concentração, pré-tratamento e conservação das lamas ativadas;

Condições de realização do ensaio

— Temperatura de ensaio, pH durante o ensaio e duração da fase ou das fases de exposição;

Resultados

— Consumo de oxigénio dos controlos específicos (mg O_2/(g lamas × h);

— Todos os dados determinados, curva(s) de inibição e método de cálculo da EC_{50};

— EC_{50} e, se possível, limites de confiança a 95 %; eventualmente, EC_{20}, EC_{80}; eventualmente, NOEC e métodos estatísticos utilizados, caso a EC_{50} não possa ser determinada;

— Resultados para a inibição total e, se for caso disso, para a inibição devida à respiração heterotrófica e à nitrificação;

— Consumo de oxigénio abiótico no controlo físico-químico (se utilizado);

— Nome do produto químico de referência e resultados obtidos com o mesmo;

— Quaisquer observações e desvios ao presente método de ensaio que possam influenciar os resultados.

REFERÊNCIAS

(1) Brown, D., Hitz, H. R. & Schäfer, L. (1981). The assessment of the possible inhibitory effect of dyestuffs on aerobic waste-water bacteria, Experience with a screening test. *Chemosphere* 10 (3): 245-261.

▼M6

(2) King, E. F. & Painter H. A. (1986). Inhibition of respiration of activated sludge; variability and reproducibility of results. *Toxicity Assessment* 1(1): 27-39.

(3) OCDE (1984), Activated sludge, Respiration inhibition test, Test Guideline No. 209, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

(4) ISO (2007). ISO 8192 Water Quality — Test for inhibition of oxygen consumption by activated sludge for carbonaceous and ammonium oxidation, International Organization for Standardization.

(5) Bealing, D. J. (2003). Document ISO/TC147/WGI/N.183, International Organization for Standardization.

(6) Painter, H. A, Jones, K. (1963). The use of the wide-bore dropping-mercury electrode for the determination of the rates of oxygen uptake and oxidation of ammonia by micro-orgranisms. *Journal of Applied Bacteriology* 26 (3): 471-483.

(7) Painter, H. A. (1986). Testing the toxicity of chemicals by the inhibition of respiration of activated sludge. *Toxicity Assessment* 1:515-524.

(8) Robra, B. (1976). Wasser/Abwasser 117, 80.

(9) Fiebig, S. & Noack, U. (2004). The use of copper(II)sulphate pentahydrate as reference substance in the activated sludge respiration inhibition test — acc. to the OECD guideline 209. *Fresenius Environmental Bulletin* 13 No. 12b: 1556-1557.

(10) ISO (1995). ISO 10634 Water Quality — Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in aqueous medium, International Organization for Standardization.

(11) OCDE (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application, Series on testing and assessment No. 54, ENV/JM/MONO(2006)18, OECD, Paris.

▼**M6**

Apêndice 1

Definições

Para efeitos do presente método, entende-se por:

Produto químico: uma substância ou mistura.

EC_x (concentração com x % de efeitos): concentração que causa efeitos em x % dos organismos ensaiados num determinado período de exposição, comparativamente ao grupo de controlo. Por exemplo, a EC_{50} é a concentração que se estima que, num ponto final do ensaio, terá efeito em 50 % da população exposta, num período de exposição definido.

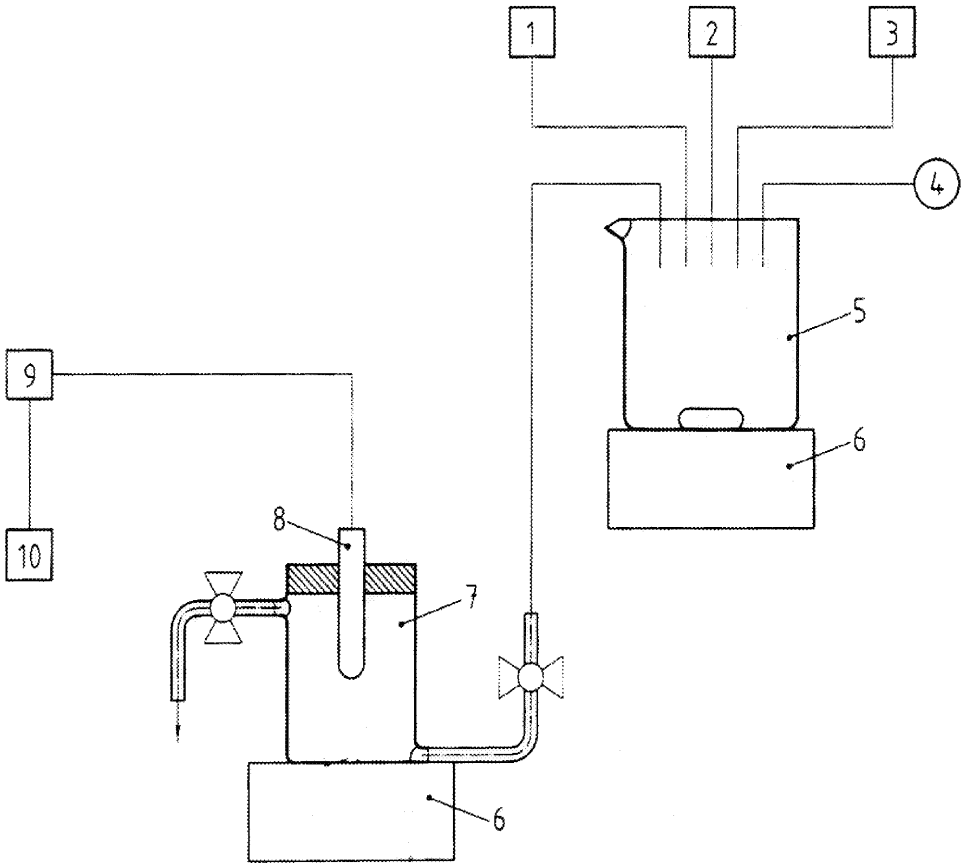
NOEC (concentração sem efeitos observáveis): concentração do produto químico em estudo à qual não se observa nenhum efeito do mesmo. Neste ensaio, a concentração NOEC não tem nenhum efeito com significância estatística ($p < 0,05$) num determinado período de exposição, comparativamente ao grupo de controlo.

Produto químico em estudo: qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado o presente método de ensaio.

▼**M6**

Apêndice 2

Figura 1: **Exemplos de unidade de medição**



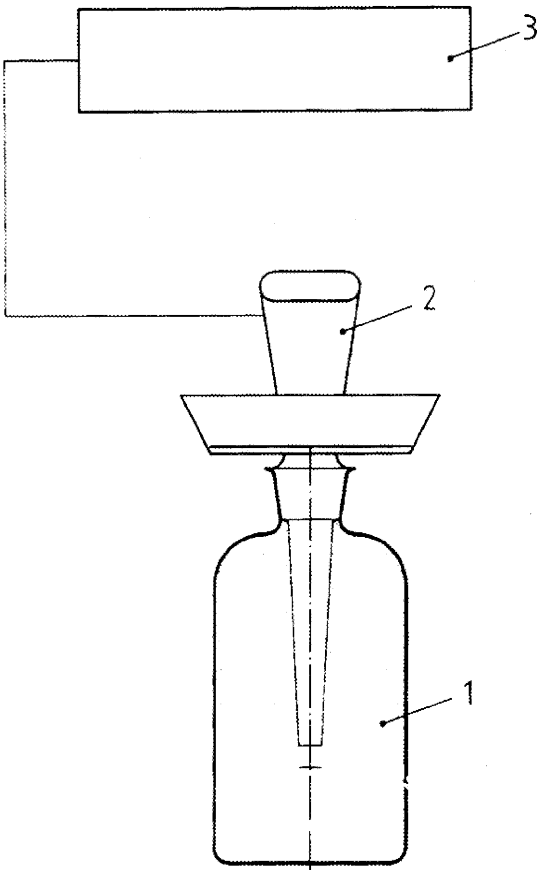
Legenda:

1	Lamas ativadas	6	Agitador magnético
2	Meio sintético	7	Célula de medição do oxigénio
3	Produto químico em estudo	8	Elétrodo de oxigénio
4	Ar	9	Instrumento de medição do oxigénio
5	Recipiente de mistura	10	Registador

▼**M6**

Apêndice 3

Figura 2: **Exemplo de unidade de medição por recurso a uma garrafa de CBO**



Legenda:

1 Recipiente de ensaio

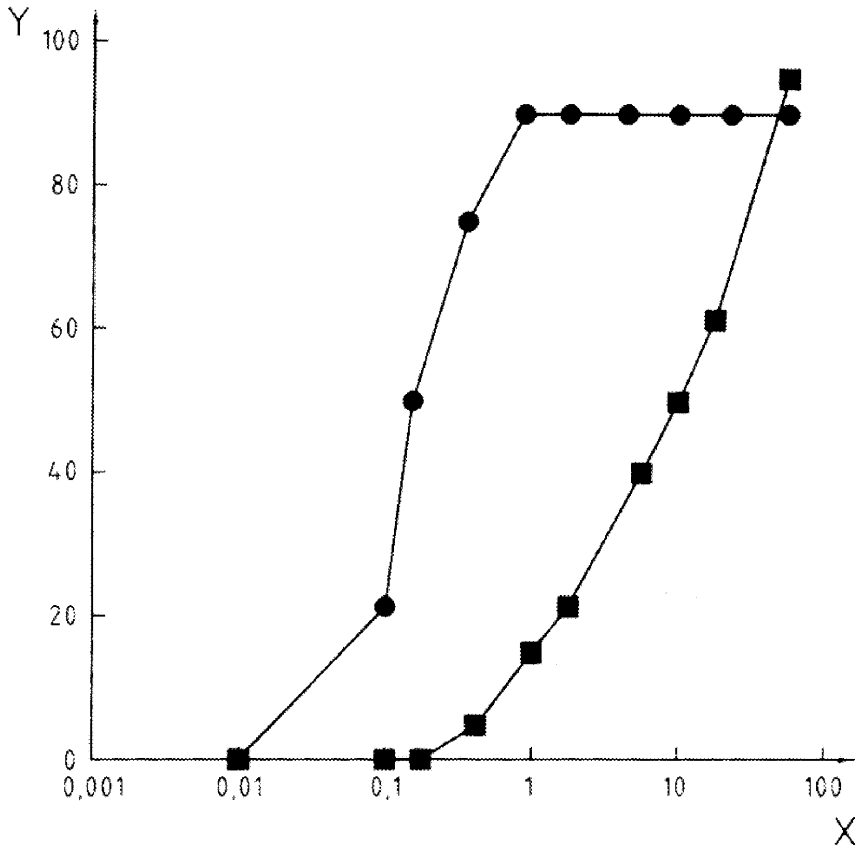
2 Elétrodo de oxigénio

3 Instrumento de medição do oxigénio

▼**M6**

Apêndice 4

Figura 3: **Exemplo de curvas de inibição**



Legenda:

X Concentração de 3,5-diclorofenol (mg/l)

Y Inibição (%)

■ Inibição da respiração heterotrófica por recurso a lamas nitrificantes

● Inibição da nitrificação por recurso a lamas nitrificantes.

▼B

C.12. **BIODEGRADAÇÃO**

ENSAIO LASC MODIFICADO

1. **MÉTODO**

1.1. INTRODUÇÃO

O objectivo do método é avaliar a biodegradação final potencial de substâncias orgânicas solúveis em água e não voláteis quando expostas a concentrações relativamente elevadas de microorganismos durante um longo período de tempo. Durante este período, a viabilidade dos microorganismos é mantida através da adição diária de uma alimentação de águas residuais decantadas. (Para conservação das águas residuais durante o fim-de-semana as mesmas poderão ser guardadas a 4°C. Podem-se utilizar alternativamente as águas residuais sintéticas do ensaio de confirmação da OCDE.)

Pode verificar-se uma adsorção físico-química aos sólidos suspensos, o que deve ser tomado em consideração na interpretação dos resultados (ver 3.2).

Devido ao extenso período de retenção da fase líquida (36 horas) e à adição intermitente de nutrientes, o ensaio não simula as condições que ocorrem numa estação de tratamento de águas residuais. Os resultados obtidos com várias substâncias de ensaio indicam que o ensaio apresenta um elevado potencial de biodegradação.

As condições do ensaio são altamente favoráveis à selecção e/ou adaptação de microorganismos capazes de degradar o composto ensaiado. (O procedimento pode igualmente ser utilizado na produção de inóculos adaptados para utilização em outros ensaios.)

No presente método, utiliza-se a medida da concentração de carbono orgânico dissolvido na avaliação da biodegradação final das substâncias de ensaio. É preferível determinar o COD após acidificação e purificação do que através da diferença de C_{total} — $C_{inorgânico}$.

A utilização simultânea de um método analítico específico pode permitir a avaliação da degradação primária da substância (desaparecimento da estrutura química original).

O método apenas se aplica às substâncias orgânicas de ensaio que, nas concentrações utilizadas no ensaio:

— são solúveis em água (pelo menos 20 mg de carbono orgânico dissolvido/l),

— possuem uma pressão de vapor negligenciável,

— não adsorvem significativamente no sistema de ensaio,

— não se perdem na solução de ensaio devido a formação de espuma,

— não exercem efeitos inibidores sobre as bactérias.

Deve ser determinado o teor em carbono orgânico da substância de ensaio,

▼B

As informações respeitantes às proporções relativas dos componentes principais das substâncias de ensaio serão úteis na interpretação dos resultados obtidos, especialmente nos casos em que os resultados são baixos ou marginais.

As informações relativas à toxicidade da substância para os micro-organismos podem ser úteis na interpretação dos resultados baixos e na selecção das concentrações de ensaio adequadas.

1.2. DEFINIÇÕES E UNIDADES

C_E = concentração do composto ensaiado em carbono orgânico presente ou adicionado às águas residuais decantadas no início do período de arejamento (mg/l),

C_e = concentração do carbono orgânico dissolvido presente no licor sobrenadante do ensaio no final do período de arejamento (mg/l),

C_c = concentração do carbono orgânico dissolvido presente no licor sobranadante do controlo no final do período de arejamento (mg/l).

No presente método a biodegradação é definida como o desaparecimento de carbono orgânico. A biodegradação pode ser expressa em:

1. Remoção em percentagem D_{ad} da quantidade de substância adicionada diariamente:

$$D_{da} = \frac{C_T - (C_T - C_c)}{C_T} \times 100 \qquad [1]$$

em que:

D_{ad} = degradação/adição diária.

2. A remoção em percentagem D_{ad} da quantidade de substância presente no início de cada dia:

$$D_{ssd} = \frac{2C_T + C_{ti} - C_{ci} - 3C_{t(i+1)} + 3C_{c(i+1)}}{2C_T + C_{ti} - C_{ci}} \times 100 \qquad [2(a)]$$

$$\approx \frac{2C_T - 2(C_t - C_c)}{2C_T + (C_t - C_c)} \times 100 \qquad [2(b)]$$

em que:

D_{ad} = degradação/substância no início do dia;

em que os índices i e (i + l)se referem ao dia da medição.

A equação 2(a) é recomendada se o COD do efluente variar de um dia para outro, enquanto a equação 2(b) pode ser utilizada quando o COD do efluente permanece relativamente constante de um dia para o outro.

▼B

1.3. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

Em alguns casos, quando se investiga uma nova substância, podem ser úteis substâncias de referência; contudo, não se recomenda aqui qualquer substância de referência específica.

Fornecem-se dados relativos a diversos compostos avaliados em ensaios de intercalibração (ver apêndice 1) de modo a que se possa fazer a calibração do método de tempos a tempos e a permitir a comparação dos resultados quando se utiliza outro método.

1.4. PRINCIPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

Numa unidade de lamas activadas semicontínua (LASC), colocam-se lamas activadas provenientes de uma estação de tratamento de águas residuais. Adicionam-se o composto a ensaiar e as águas residuais domésticas decantadas e a mistura é arejada durante 23 horas. Pára-se depois o arejamento, permitindo a sedimentação das lamas e retira-se o licor sobrenadante.

As lamas que permanecem no tanque de arejamento são então misturadas com outra alíquota do composto de ensaio e águas residuais e repete-se o processo.

Avalia-se a biodegradação através da determinação do teor em carbono orgânico dissolvido no licor sobrenadante. Compara-se este valor com o que se obtém para o licor proveniente de um tubo de controlo contendo apenas águas residuais decantadas.

Quando se utiliza um método analítico específico, podem medir-se alterações na concentração da molécula original devido a biodegradação (Biodegradação primária).

1.5. CRITÉRIOS DE QUALIDADE

A reprodutibilidade do presente método baseado na remoção do carbono orgânico dissolvido ainda não foi, estabelecida. (Quando se considera a biodegradação primária, obtém-se dados muito precisos para substâncias que são consideravelmente degradadas.)

A sensibilidade do método é determinada em larga medida pela variabilidade do ensaio em branco e, em menor extensão, pela precisão da determinação do carbono orgânico dissolvido e teor do composto de ensaio no licor, no início de cada ciclo.

1.6. DETENÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.6.1. *Preparações*

Ligam-se um número suficiente de unidades de arejamento limpas (pode-se utilizar alternativamente a unidade de ensaio de 1,51 de LASC inicial) e tubos para entrada do ar (figura 1) para cada substância de ensaio e controlo. O ar comprimido fornecido às unidades de ensaio, limpo através de um filtro de algodão, deve ser isento de carbono orgânico e pré-saturado com água de modo a reduzir as perdas por evaporação.

De uma estação de lamas activadas que trate predominantemente águas residuais domésticas, retira-se uma amostra de licor misto contendo 1 a 4 g de sólidos suspensos/l. São necessários por cada unidade de arejamento cerca de 150 ml de licor misto.

▼B

Preparam-se soluções de reserva da substância de ensaio em água destilada; a concentração normalmente exigida é de 400 mg/l como carbono orgânico o que dá uma concentração no composto de ensaio de 20 mg/l de carbono no início de cada ciclo de arejamento se não se verificar biodegradação.

É possível utilizar concentrações mais elevadas se a toxicidade em relação aos microorganismos o permitir.

Mede-se o teor em carbono orgânico nas soluções de reserva.

1.6.2. *Condições de ensaio*

O ensaio deve efectuar-se a 20 a 25 °C.

Utiliza-se uma concentração elevada de microorganismos aeróbios (de 1 a 4 g/l de sólidos suspensos) e o período de retenção efectiva é de 36 horas. As substâncias carbonadas presentes nas águas residuais de alimentação são largamente oxidadas, em geral no espaço de oito horas após o início de cada cicio de arejamento. Em seguida, verifica-se uma respiração endógena das lamas durante o restante período de arejamento, no decurso do qual o único substrato disponível é o composto de ensaio a não ser que este seja também rapidamente metabolizado. Estas características associadas a uma reinoculação diária do ensaio quando são utilizadas como meio águas residuais domésticas fornecem condições altamente favoráveis tanto para a adaptação como para elevados graus de biodegradação.

1.6.3. *Execução do ensaio*

Retira-se uma amostra de licor misto de uma unidade laboratorial ou estação de lamas activadas predominantemente doméstica e conserva-se em condições aeróbias até ser utilizada no laboratório. Cada uma das unidades de arejamento e de controlo são cheios com 150 ml de licor misto (se se utilizar a unidade de ensaio LASC, multiplicar por 10 os volumes dados) e dá-se início ao arejamento. Após 23 horas, interrompe-se o arejamento e deixam-se sedimentar as lamas durante 45 minutos. Abrem-se sucessivamente as torneiras de cada um dos recipientes e rejeitam-se fracções de 100 ml do licor sobrenadante. Recolhe-se uma amostra de águas residuais domésticas decantadas imediatamente antes da utilização e adicionam-se 100 ml às lamas remanescentes em cada unidade de arejamento. Recomeça-se de novo o arejamento. Nesta fase, não se adicionam quaisquer substâncias de ensaio e as unidades são diariamente alimentadas com águas residuais domésticas apenas até ao momento em que se obtém na decantação um licor sobrenadante límpido. Este processo demora geralmente duas semanas, no fim das quais o carbono orgânico dissolvido no licor sobrenadante no final de cada ciclo de arejamento se aproxima de um valor constante.

No final deste período, misturam-se as lamas decantadas separadamente e adicionam-se a cada unidade 50 ml das lamas compostas resultantes.

Adicionam-se às unidades de controlo 95 ml de águas residuais decantadas mais 5 ml de água e às unidades de ensaio 95 ml mais 5 ml da solução adequada de reserva do composto de ensaio (400 mg/l). Recomeça-se de novo o are|2mento que prossegue durante 23 horas. Deixam-se então sedimentar as lamas durante 45 minutos e o sobrenadante é retirado e analisado o seu teor em carbono orgânico dissolvido.

Este processo de enchimento e esvaziamento é repetido diariamente ao longo do ensaio.

▼B

Antes da sedimentação pode ser necessário limpar as paredes das unidades de modo a evitar a acumulação de sólidos acima do nível do líquido. Para evitar uma contaminação cruzada, utilizam-se raspadores ou escovas individuais para cada unidade.

O ideal seria determinar diariamente o carbono orgânico dissolvidos nos licores sobrenadantes, embora sejam admissíveis análises menos frequentes. Antes da análise, os licores são filtrados através de filtros limpos de membrana de 0,45 mm ou centrifugados. Os filtros de membrana são adequados se se garantir que nem libertam carbono nem absorvem a substância durante o processo de filtração. A temperatura da amostra não deve exceder 40°C quando se encontra na centrífuga.

A duração do ensaio para compostos que apresentam uma biodegradação fraca ou nula é indeterminada, mas a experiência sugere que deve ser, em geral, de pelo menos 12 semanas, mas nunca mais de 26 semanas.

2. RESULTADOS E AVALIAÇÃO

Representam-se graficamente, em função do tempo, os valores de carbono orgânico dissolvido nos licores sobrenadantes das unidades de ensaio e das unidades de controlo.

À medida que ocorre a biodegradação, o nível obtido no ensaio aproximar-se-á do obtido no controlo. Quando se verificar que a diferença entre os dois níveis é constante ao longo de três medições consecutivas, efectua-se o número de medições posteriores que seja necessário para permitir o tratamento estatístico dos dados e calcula-se a percentagem de biodegradação do composto de ensaio (D_{ad}, D_{sid}, ver 1.2).

3. RELATÓRIO

3.1. RELATÓRIO DO ENSAIO

O relatório do ensaio, deve incluir, se possível, as seguintes informações:

— todas as informações relativas à natureza das águas residuais, tipo de unidade utilizada e resultados experimentais respeitantes à substância ensaiada, substância de referência se utilizada e ensaio em branco,

— a temperatura,

— a curva de remoção com a descrição e processo de cálculo (ver 1.2),

— data e local onde foram recolhidas as lamas activadas e as águas residuais, estado de adaptação, concentração, etc.,

— razões científicas de quaisquer alterações da metodologia,

— assinatura e data.

▼B

3.2. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Uma vez que a substância a ser ensaiada através do presente método não será imediatamente biodegradável, qualquer remoção do COD devido apenas à biodegradação será normalmente gradual ao longo de vários dias ou semanas, excepto nos casos em que a adaptação é repentina, tal como é indicado por uma remoção abrupta que ocorra após algumas semanas.

Todavia, a adsorção físico-química pode, por vezes, desempenhar um papel importante; isto verifica-se quando há uma remoção total ou parcial do COD adicionado no início. O que acontece posteriormente depende de factores tais como os graus de adsorção e a concentração dos sólidos em suspensão no efluente rejeitado. Em geral, a diferença entre a concentração de COD nos licores sobrenadantes do controlo e do ensaio aumenta gradualmente a partir de um valor inicial baixo e esta diferença mantém-se então ao nível do novo valor durante o resto da experiência, a menos que tenha lugar a adaptação.

Se for necessário estabelecer uma distinção entre biodegradação (ou biodegradação parcial) e adsorção, são necessários outros ensaios. Esta distinção pode ser obtida de diferentes modos mas o mais convincente é utilizar como inóculo o licor sobrenadante, ou as lamas, num método de base (de preferência um ensaio respirométrico).

As substâncias de ensaio que no presente ensaio apresentam remoções elevadas de COD não devidas a adsorção devem ser consideradas como potencialmente biodegradáveis.

Uma remoção parcial não devida a adsorção indica que a substância é sujeita pelo menos a alguma biodegradação. Uma remoção baixa ou nula de COD pode ser devida a inibição dos microorganismos pela substância de ensaio e isto pode também ser demonstrado pela lise e perda de lamas, dando origem a sobrenadantes turvos. O ensaio deve ser repetido, utilizando uma concentração mais baixa de substância de ensaio.

A utilização de um método analítico específico ou da substância de ensaio marcada com ^{14}C pode permitir uma maior sensibilidade. No caso do composto de ensaio marcado com ^{14}C, a recuperação de $^{14}CO_2$ confirmará que se verificou biodegradação.

Quando os resultados se expressam também em termos de biodegradação primária, deve ser fornecida, se possível, uma explicação relativa à alteração de estrutura química que conduz à perda de resposta da substância de ensaio original.

A validação do método analítico deve ser fornecida conjuntamente com a resposta obtida no ensaio em branco.

4. **REFERÊNCIAS**

(1) OCDE, Paris, 1981, *Test Guideline 302 A,* Decisão C(81) 30 final do Conselho.

▼B

Apêndice 1

Ensaio LASC: EXEMPLOS DE RESULTADOS

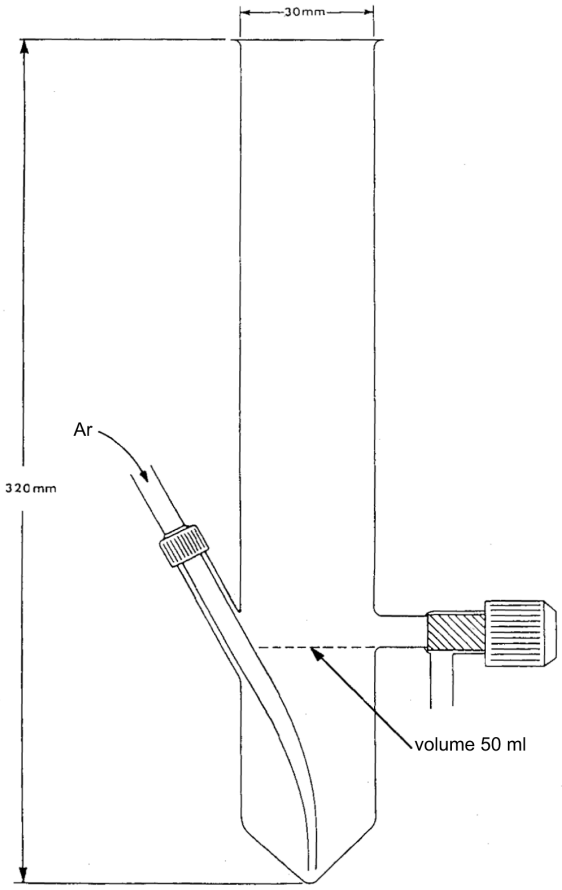
Substâncias	C_E (mg/l)	$c_e - c_c$ (mg/l)	Percentagem de biodegradação	Duração de ensaio (dias)
Sulfonato de 4-acetilaminobenzeno	17,2	2,0	85	40
Sulfonato de tetrapropilenobenzeno	17,3	8,4	51,4	40
4-nitrofenol	16,9	0,8	95,3	40
Dietilenoglicol	16,5	0,2	98,8	40
Anilina	16,9	1,7	95,9	40
Tetracarboxilato de ciclopentano	17,9	3,2	81,1	120

▼B

Apêndice 2

Exemplo de equipamento

Figure 1



▼M7

C.13 BIOACUMULAÇÃO EM PEIXES: EXPOSIÇÃO PELAS VIAS AQUOSA E ALIMENTAR

INTRODUÇÃO

O presente método de ensaio é equivalente ao *Test Guideline* 305 (2012) da OCDE. O principal objetivo da presente revisão do método de ensaio engloba duas vertentes. Em primeiro lugar, visa integrar um ensaio de bioacumulação por via alimentar [1] adequado para determinar o potencial de bioacumulação das substâncias muito pouco solúveis na água. Em segundo lugar, visa criar um método de ensaio que, sempre que adequado, utilize um número mais reduzido de peixes por razões de proteção dos animais e que seja mais eficaz em termos de custos.

Nos anos decorridos desde a adoção do método de ensaio consolidado C.13 (1), inúmeras substâncias foram objeto de ensaios e os laboratórios, bem como as entidades reguladoras, adquiriram experiência significativa. Tal conduziu à convicção de que a complexidade do ensaio pode ser reduzida caso sejam cumpridos critérios específicos (*cf.* ponto 88) e de que é possível uma abordagem escalonada. A experiência demonstrou igualmente que fatores biológicos como o crescimento e o teor de lípidos dos peixes podem afetar significativamente os resultados e pode ser necessário tomá-los em consideração. Por outro lado, já foi reconhecido que a realização de ensaios a substâncias muito pouco solúveis na água pode ser tecnicamente impossível. Por outro lado, no que se refere às substâncias muito pouco solúveis na água, a exposição através do meio aquático pode ser de importância limitada em relação à via alimentar. O que precede conduziu ao desenvolvimento de um método de ensaio no qual os peixes são expostos por via alimentar (*cf.* pontos 7-14 e 97 e seguintes). A validação (ensaio interlaboratorial) do ensaio de exposição por via alimentar foi realizada em 2010 (51).

As principais alterações são as seguintes:

— A utilização de uma única concentração de ensaio pode ser considerada suficiente, sempre que seja provável que o fator de bioconcentração (BCF) não dependa da concentração de ensaio.

— Ensaio de exposição aquosa de conceção minimizada no qual é possível utilizar um número reduzido de pontos de amostragem, caso se cumpram critérios específicos.

— Deve medir-se o teor de lípidos dos peixes para que seja possível expressar o BCF numa base de 5 % de teor de lípidos.

— Maior ênfase na estimativa do BCF cinético (sempre que possível) a par da estimativa do BCF em estado estacionário.

— No que diz respeito a determinados grupos de substâncias, será proposto um ensaio de exposição por via alimentar, nos casos em que tal se considere mais adequado do que um ensaio de exposição aquosa.

— Os peixes devem ser pesados de modo a corrigir o BCF_k em função da diluição de crescimento.

Antes de se efetuar qualquer ensaio de bioacumulação, deve dispor-se da seguinte informação sobre a substância em estudo:

(a) Sensibilidade da técnica analítica para a medição das concentrações nos tecidos, na água ou nos alimentos tanto da substância em estudo como de possíveis metabolitos (*cf.* ponto 65).

(b) Solubilidade em água [método A.6; (2)]; deve ser determinada por um método adequado para o intervalo (estimado) da solubilidade com vista a obter um valor fiável. No respeitante às substâncias hidrófobas, utiliza-se, em geral, o método de eluição em coluna.

[1] Ver apêndice 1 para definições e unidades

▼M7

(c) Coeficiente de partição *n*-octanol/água K_{OW} [1] [métodos A.8 (4), A.24 (5), A.23 (6)]; ou outras informações adequadas sobre o comportamento de partição (por exemplo, adsorção/dessorção em lípidos, K_{OC}); Estes parâmetros devem ser determinados por um método adequado para o intervalo (estimado) do K_{OW}, com vista a obter um valor fiável. No respeitante às substâncias hidrófobas, este será, em geral, o método de agitação lenta [método A.23 (6)];

(d) Estabilidade da substância em água (hidrólise [método C.7 (7)];

(e) Estabilidade da substância nos alimentos (especificamente quando é selecionado um método de ensaio de exposição por via alimentar);

(f) Dados sobre fototransformação relevantes para as condições de irradiação do ensaio (8);

(g) Tensão superficial (no caso de substâncias cujo log K_{OW} não possa ser determinado) [método A.5 (9)];

(h) Pressão de vapor [método A.4 (10)];

(i) Quaisquer informações sobre degradação biótica ou abiótica em água, tais como — mas não exclusivamente — a biodegradabilidade «fácil» [métodos C.4 partes II a VII (11), C.29 (12)], sempre que adequado;

(j) Informações sobre metabolitos: estrutura, log K_{OW}, formação e degradabilidade, sempre que adequado;

(k) Constante de dissociação (pK_a) para substâncias ionizáveis. Se necessário, o pH da água do ensaio deve ser ajustado para garantir que a substância se encontra na sua forma não ionizada no ensaio, caso tal seja compatível com as espécies de peixes.

Independentemente do método de exposição ou do sistema de amostragem selecionado, o presente método de ensaio descreve um procedimento para a caracterização do potencial de bioacumulação de substâncias nos peixes. Embora seja largamente preferível o recurso a regimes dinâmicos, podem também utilizar-se regimes semiestáticos, na condição de serem satisfeitos os critérios de validade (*cf.* pontos 24 e 113). No caso da exposição por via alimentar, o regime dinâmico não é necessário para manter as concentrações da substância em estudo na água, mas ajudará a manter concentrações adequadas de oxigénio dissolvido e contribuirá para proporcionar água limpa e eliminar influências, por exemplo, dos produtos de excreção.

Independentemente do método selecionado, o presente protocolo fornece informações suficientes para a realização do ensaio, permitindo todavia a adaptação das condições experimentais ao perfil dos laboratórios e às características dos produtos químicos em estudo. O ensaio de exposição em meio aquoso é mais adequado às substâncias orgânicas estáveis com log K_{OW} compreendido entre 1,5 e 6,0 (13) podendo, no entanto, aplicar-se também a substâncias muito hidrófobas (log K_{OW} > 6,0), se for possível demonstrar que a substância se dissolve totalmente na água, produzindo uma concentração estável. Se tal não for possível, um estudo em meio aquoso não é adequado, sendo necessário um método por via alimentar para proceder ao ensaio da substância em peixes — embora a interpretação e utilização dos resultados do ensaio por via alimentar possam depender do quadro regulamentar. A equação de Bintein *et al.* (14) permite obter uma

[1] Por vezes referido como P_{OW}; é determinado por um método de agitação do recipiente no método A.8 (4), um método de HPLC no método A.24 (5) e um método de agitação lenta no método A.23 (6). O método de colunas geradoras é ocasionalmente utilizado para a determinação do log K_{OW}. Encontra-se disponível um número limitado de estudos que utilizam este método, sobretudo para dibenzodioxinas e bifenilos clorados (por exemplo, Li e Doucette, 1993) (3). No que diz respeito às substâncias ionizáveis, o log K_{OW} deve referir-se à forma não ionizada.

▼M7

estimativa preliminar do fator de bioconcentração (BCF, por vezes designado K_B) de substâncias orgânicas com valores log K_{OW} até 9,0. A estimativa preliminar do fator de bioconcentração das referidas substâncias muito hidrófobas pode ser superior ao fator de bioconcentração do estado estacionário (BCF_{SS}) obtido por via experimental, especialmente quando é utilizado um modelo linear simples para a estimativa preliminar. Os parâmetros que caracterizam o potencial de bioacumulação incluem a constante de velocidade de fixação (k_1) e constantes da velocidade de perda tais como a constante da velocidade de depuração (k_2), o fator de bioconcentração do estado estacionário (BCF_{SS}), o fator de bioconcentração cinético (BCF_K) e o fator de bioamplificação por via alimentar (BMF) ([1]).

O recurso a substâncias com marcação radioativa poderá facilitar a análise de amostras de água, alimentos e de peixes, bem como a determinação da necessidade de identificar e quantificar os metabolitos. Se os resíduos radioativos totais forem medidos isoladamente (por exemplo, por combustão ou solubilização de tecidos), o BCF ou BMF é calculado com base no total da substância de origem, quaisquer metabolitos fixados e também no carbono assimilado. Portanto, os valores BCF ou BMF calculados com base nos resíduos radioativos não são diretamente comparáveis a um BCF ou BMF decorrente de análise química específica da substância de origem. É possível utilizar procedimentos de separação como TLC, HPLC ou GC ([2]) antes da análise em estudos com marcação radioativa para determinar o BCF ou BMF com base na substância de origem. Sempre que se utilizem técnicas de separação, deve proceder-se à identificação e quantificação da substância de origem e dos metabolitos relevantes ([3]) (*cf.* ponto 65) caso o BCF ou BMF seja calculado com base na concentração da substância de origem nos peixes e não no total dos resíduos com marcação radioativa. É também possível combinar um estudo de metabolismo dos peixes ou de distribuição *in vivo* com um estudo de bioacumulação, mediante a análise e identificação dos resíduos em tecidos. A possibilidade de realizar um estudo de metabolismo pode ser prevista por instrumentos adequados — por exemplo, ferramenta QSAR da OCDE (15) e programas exclusivos desta ferramenta.

A decisão de realizar um ensaio de exposição por via aquosa ou alimentar, bem como a configuração deste, devem basear-se nos fatores enumerados no ponto 3, tomados em consideração em conjunto com o quadro regulamentar aplicável. Por exemplo, no que se refere às substâncias com log K_{OW} elevado que apresentam, todavia, uma solubilidade considerável em água no que diz respeito à sensibilidade das técnicas analíticas disponíveis, considerar-se-ia primeiramente um ensaio de exposição aquosa. Contudo, é possível que as informações relativas à solubilidade em água não sejam definitivas no que se refere a estes tipos de substâncias hidrófobas, pelo que se deve ponderar a possibilidade de preparar concentrações aquosas dissolvidas estáveis e quantificáveis (não são permitidas emulsões estáveis) adequadas a um estudo de exposição aquosa, antes da tomada de uma decisão sobre o método de ensaio a utilizar (16). Não é possível apresentar orientações normativas exatas sobre o método a utilizar com base em critérios de exclusão relativos à solubilidade em água e ao coeficiente de partição octanol-água, uma vez que outros fatores (técnicas analíticas, degradação, adsorção, etc.) podem influenciar significativamente a aplicabilidade do método pelos motivos apresentados supra. Porém, um log K_{OW} superior a 5 e uma solubilidade em água inferior a ~ 0,01 — 0,1 mg/l identificam o conjunto de substâncias cujo ensaio através de exposição aquosa se pode tornar cada vez mais difícil.

Devem tomar-se em conta outros fatores que podem influenciar a seleção do ensaio, como o potencial de adsorção da substância nos recipientes e equipamentos de ensaio, a sua estabilidade em solução aquosa por oposição à estabilidade no alimento para peixes (17) (18), etc.

É possível encontrar informações sobre estes aspetos práticos noutros estudos em meio aquoso já realizados. Encontram-se disponíveis na bibliografia informações adicionais sobre a avaliação dos aspetos relativos ao desempenho dos estudos de bioacumulação (por exemplo, (19)).

No que se refere às substâncias cuja solubilidade ou manutenção da concentração aquosa, bem como a análise destas concentrações, não representem um obstáculo

([1]) Ver apêndice 1 para definições e unidades

([2]) TLC: cromatografia em camada fina; HPLC: cromatografia em fase líquida a alta pressão; GC: cromatografia gasosa

([3]) Em alguns quadros regulamentares, a análise dos metabolitos pode ser obrigatória quando estiverem reunidas determinadas condições (*cf.* ponto 65).

▼M7

à aplicação de um método de exposição aquosa, o presente método é preferível para determinar o potencial de bioconcentração da substância. De qualquer modo, deve verificar-se se a concentração ou concentrações de exposição por via aquosa a utilizar se encontram dentro dos limites de solubilidade em água dos meios de ensaio. É possível utilizar diferentes métodos para manter a estabilidade das concentrações da substância em estudo dissolvida, tais como soluções de reserva ou sistemas de dosagem passiva (por exemplo, método de eluição em coluna), desde que se consiga demonstrar que é possível manter concentrações estáveis e os meios de ensaio não se desviem dos recomendados no ponto 27.

No que se refere às substâncias muito hidrófobas (log K_{OW} > 5 e a uma solubilidade inferior a ~ 0,01-0,1 mg/l), o ensaio através de exposição aquosa pode tornar-se difícil. Os motivos para as limitações podem ser a impossibilidade de manter a concentração aquosa a um nível considerado suficientemente constante (por exemplo, devido à adsorção/dessorção para o vidro dos recipientes de exposição ou a fixação rápida pelos peixes) ou ao facto de as concentrações aquosas a aplicar serem tão reduzidas que se encontram no mesmo intervalo que o limite analítico de quantificação, ou abaixo deste ([1]). Para estas substâncias, recomenda-se o ensaio por via alimentar, desde que este seja coerente com o quadro regulamentar aplicável e as necessidades de avaliação dos riscos.

No que se refere aos agentes tensioativos, deve analisar-se se o ensaio de bioconcentração aquosa é viável, atendendo às propriedades da substância; caso contrário, o estudo por via alimentar é provavelmente mais adequado. Os agentes tensioativos são agentes que atuam na superfície, reduzindo a tensão interfacial entre dois líquidos. A sua natureza anfipática (*ou seja,* contêm uma parte hidrófila e uma parte hidrófoba) faz com que se acumulem em interfaces como a interface água-ar, a interface água-alimento e as paredes de vidro, o que dificulta a determinação da sua concentração aquosa.

O ensaio por via alimentar pode contornar alguns dos aspetos da exposição no que se refere a misturas complexas com componentes de limites distintos de solubilidade em água, na medida em que a exposição comparável a todos os componentes da mistura é mais provável do que no método aquoso (*cf.* (20)).

Importa salientar que o método por via alimentar produz um fator de bioamplificação em vez de um fator de bioconcentração (BCF) ([2]). Encontram-se disponíveis métodos para estimar um fator de bioconcentração cinético (BCF_K) a partir dos dados gerados no estudo por via alimentar (tal como discutido no apêndice 8, mas estes métodos devem ser utilizados com precaução. Em geral, estes métodos pressupõem uma cinética de primeira ordem e são aplicáveis apenas a determinados grupos de substâncias. É pouco provável que estes métodos sejam aplicáveis a agentes tensioativos (ver ponto 12).

Deve utilizar-se um ensaio de exposição aquosa de tipo minimizado, com menos pontos de amostragem, para reduzir o número de animais e/ou recursos (*cf.* ponto 83 e seguintes) apenas às substâncias relativamente às quais existem motivos para prever que a fixação e a depuração seguirão aproximadamente uma cinética de primeira ordem (*ou seja,* em geral, substâncias orgânicas não ionizadas -*cf.* ponto 88).

C.13 — I ENSAIO DE BIOCONCENTRAÇÃO DA EXPOSIÇÃO AQUOSA EM PEIXES

PRINCÍPIO DO ENSAIO

O ensaio compreende duas fases: a fase de exposição (fixação) e a fase de pós-exposição (depuração). Durante a fase de fixação, um grupo de peixes de uma espécie é exposto à substância em estudo numa ou mais concentrações selecionadas, em função das propriedades da substância em estudo (cf. ponto 49).

([1]) Em geral, as concentrações medidas na água durante a fase de fixação devem ser, pelo menos, de uma ordem de grandeza superior ao limite de quantificação, de modo a que seja possível medir mais do que uma semivida de carga corporal na fase de depuração do estudo.

([2]) Ver apêndice 1 para definições e unidades

▼M7

Seguidamente, os animais são transferidos para um meio isento da referida substância, onde decorre a fase de depuração. Esta última é sempre necessária, exceto no caso de a quantidade de substância absorvida na fase de fixação ser desprezável. A concentração da substância em estudo no peixe ou em determinados tecidos do mesmo é monitorizada em ambas as fases do ensaio. Além do grupo exposto, submete-se um grupo de peixes a condições idênticas, exceto no que respeita à substância em estudo, que é omitida, de modo a estabelecer uma correlação entre os eventuais efeitos negativos observados no ensaio de bioconcentração com um grupo de controlo de referência e a obter as concentrações de fundo da substância em estudo ([1]).

No ensaio de exposição por via aquosa, a fase de fixação dura, em geral, 28 dias. A duração pode ser prolongada, se necessário (*cf.* ponto 18), ou reduzida, caso se demonstre o surgimento precoce do estado estacionário (ver apêndice 1, definições e unidades). As equações que se apresentam no apêndice 5 permitem prever a duração da fase de fixação, bem como o surgimento do estado estacionário. O período de depuração inicia-se quando os peixes deixam de estar expostos à substância em estudo, com a sua transferência para um meio idêntico que não contenha a substância em estudo, num recipiente limpo. Sempre que possível, calcula-se o fator de bioconcentração preferencialmente como a razão entre a concentração nos peixes (C_f) e na água (C_w) em estado estacionário (BCF_{SS}; ver apêndice 1, definição) e como um fator de bioconcentração cinético (BCF_K; ver apêndice 1, definições e unidades), que se estima como a razão entre as constantes de velocidade de fixação (k_1) e de depuração (k_2) pressupondo uma cinética de primeira ordem ([2]).

Caso o estado estacionário não surja no prazo de 28 dias, calcula-se o BCF através do método cinético (*cf.* ponto 38), podendo também prolongar-se a fase de fixação. Se, desta forma, se obtiver uma fase de fixação cuja duração, até atingir o estado estacionário, a torne impraticável (*cf.* pontos 37 e 38, apêndice 5), é preferível utilizar o método cinético. Em alternativa, deve ponderar-se a realização de um ensaio por via alimentar para as substâncias muito hidrófobas ([3]), desde que este ensaio seja coerente com o quadro regulamentar aplicável.

A constante de velocidade de fixação, a constante de velocidade de depuração (ou constantes, no caso da aplicação de modelos mais complexos), o fator de bioconcentração (cinético e/ou em estado estacionário) e, sempre que possível, os intervalos de confiança de cada parâmetro, devem ser calculados com base no modelo mais adequado à descrição das concentrações da substância em estudo nos peixes e na água (*cf.* apêndice 5).

O aumento da massa dos peixes durante o ensaio resultará numa diminuição da concentração da substância em estudo nos peixes em crescimento (denominada diluição de crescimento); como tal, o BCF cinético será subestimado se não for corrigido em função do crescimento (*cf.* pontos 72 e 73).

O BCF é calculado com base na concentração total nos peixes (*ou seja,* em função da massa húmida total dos peixes). Todavia, podem utilizar-se, para fins específicos, determinados tecidos ou órgãos (por exemplo, tecido muscular ou fígado), caso as dimensões dos animais o permitam; podem também dividir-se os peixes em porções comestíveis e não comestíveis (vísceras). Uma vez que, no que respeita a muitas substâncias orgânicas, existe uma nítida relação entre o potencial de bioconcentração e a hidrofobia, existe também uma relação entre o teor de lípidos dos peixes em estudo e a bioconcentração das substâncias em

([1]) No que se refere à maior parte das substâncias em estudo, não se deve, idealmente, efetuar determinações na água de controlo. As concentrações de fundo só devem ser relevantes no caso dos materiais presentes na natureza (por exemplo, alguns metais) e as substâncias muito disseminadas no ambiente.

([2]) Caso seja inequívoco que o processo não segue uma cinética de primeira ordem, há que recorrer a modelos mais complexos (ver referências no *apêndice 5*), procurando a orientação de um perito em bioestatística.

([3]) A fixação pode ser limitada por concentrações de exposição reduzidas devido à pouca solubilidade em água no ensaio de bioconcentração, ao passo que é possível atingir concentrações de exposição muito superiores com o ensaio por via alimentar.

▼M7

causa. Assim, de modo a reduzir a variabilidade dos resultados, no que respeita às substâncias com elevada lipofilia (*ou seja,* com log K_{OW} > 3), a bioconcentração deve ser expressa de modo normalizado para um peixe com um teor de lípidos de 5 % (com base na massa corporal húmida total), para além da obtida diretamente a partir do estudo. Tal é necessário para proporcionar uma base que permita a comparação dos resultados de diferentes substâncias e/ou espécies objeto de ensaio entre si. O valor de 5 % de teor de lípidos tem sido amplamente utilizado, já que representa o teor médio de lípidos dos peixes habitualmente utilizados neste método de ensaio (21).

INFORMAÇÕES RELATIVAS À SUBSTÂNCIA EM ESTUDO

Para além das propriedades da substância em estudo apresentadas na introdução (ponto 3), as outras informações necessárias são a toxicidade para a espécie de peixe a utilizar no ensaio, de preferência a toxicidade assintótica LC_{50} (*isto é,* independente do tempo) e/ou a toxicidade estimada a partir de ensaios a longo prazo com peixes [p. ex., métodos C.47 (22), C.15 (23), C.14 (24)].

Para a quantificação da substância nas soluções de ensaio, bem como no material biológico, deve utilizar-se um método analítico adequado, de exatidão, precisão e sensibilidade conhecidas, devendo possuir-se informações pormenorizadas sobre a preparação e armazenagem da amostra. Deve também conhecer-se o limite de quantificação da substância em estudo na água e nos tecidos dos peixes. Sempre que se utilizem substâncias com marcação radioativa, estas devem ser de um grau de pureza extremamente elevado (por exemplo, de preferência > 98 %) e a percentagem de radioatividade associada às impurezas deve ser conhecida.

VALIDADE DO ENSAIO

O ensaio será considerado válido se se verificarem as seguintes condições:

A variação da temperatura da água deve ser inferior a ± 2 °C, uma vez que grandes desvios podem afetar os parâmetros biológicos relevantes para a fixação e a depuração, além de provocarem tensão aos animais;

A concentração de oxigénio dissolvido não deve ser inferior a 60 % da concentração de saturação;

A variação da concentração da substância em estudo nas células não deve exceder ± 20 % da média dos valores determinados na fase de fixação;

A concentração da substância em estudo deve ser inferior ao seu limite de solubilidade em água, tomando em consideração o efeito que a água utilizada no ensaio pode ter na solubilidade real ([1]);

A mortalidade ou quaisquer outros efeitos nocivos registados no final do ensaio, tanto no que respeita ao lote de controlo como ao lote de ensaio, deve ser inferior a 10 %; caso o ensaio se prolongue por várias semanas ou meses, os referidos efeitos não devem exceder 5 % por mês e 30 % na totalidade. Diferenças significativas no crescimento médio entre os lotes de controlo e de ensaio dos peixes recolhidos para amostra podem indicar um efeito tóxico da substância em estudo.

SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

A utilização de substâncias de referência às quais se conhece um potencial de bioconcentração e um metabolismo reduzido é útil na verificação do procedimento experimental, sempre que necessário (por exemplo, caso um laboratório não disponha de experiência anterior no ensaio ou tenham ocorrido alterações nas condições experimentais).

([1]) No que diz respeito às substâncias formadas por vários constituintes, UVCB e misturas, há que ter em conta a solubilidade em água de cada componente relevante para determinar as concentrações de exposição adequadas.

▼M7

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Equipamento

Deve evitar-se a utilização de materiais — no que se refere à totalidade do equipamento — que apresentem riscos de dissolução, absorção ou lixiviação, ou possam ter efeitos nocivos nos animais. Podem utilizar-se tanques paralelepipédicos ou cilíndricos normalizados, de um material quimicamente inerte, com capacidade adequada à população (*cf.* ponto 43). Deve reduzir-se ao mínimo a utilização de tubos de plástico flexível. Em vez disso, devem utilizar-se tubos de politetrafluoroetileno, aço inoxidável e/ou vidro. A experiência tem demonstrado que, no caso de substâncias em estudo com um coeficiente de adsorção elevado, nomeadamente os piretróides sintéticos, pode ser necessário utilizar vidro silanizado. Em tais casos, o equipamento deve ser descartado após o uso. É preferível expor os sistemas em estudo a concentrações da substância a utilizar no ensaio durante o tempo necessário para demonstrar a manutenção de concentrações de exposição estáveis previamente à introdução dos organismos utilizados no ensaio.

Água

Em princípio, o ensaio deve utilizar água natural proveniente de uma fonte não contaminada e de qualidade uniforme. Contudo, a utilização de água reconstituída (*ou seja,* água desmineralizada com adição de nutrientes específicos em quantidades conhecidas) pode ser mais adequada para garantir uma qualidade uniforme ao longo do tempo. A qualidade da água de diluição, que é a água misturada com a substância em estudo antes da introdução no recipiente de ensaio (*cf.* ponto 30), deve permitir a sobrevivência da espécie de peixes selecionada durante as fases de aclimatação e de ensaio, sem que os animais adquiram uma aparência ou um comportamento anormais. Em condições ideais, a espécie em causa deve poder sobreviver, desenvolver-se e reproduzir-se na água de diluição (nomeadamente em cultura laboratorial ou num ensaio de toxicidade em toda a vida). No que se refere à água de diluição, devem conhecer-se, pelo menos, o pH, a dureza, os sólidos totais, o carbono orgânico total (COT ([1])), bem como, de preferência, o teor de amónio e de nitritos, a alcalinidade e, no caso de ensaios com espécies marinhas, a salinidade. Os parâmetros que possuem importância para o bem-estar dos animais não são bem conhecidos; contudo, o apêndice 2 apresenta as concentrações máximas recomendadas de diversos fatores em águas doces e salgadas.

A qualidade da água de diluição deve manter-se constante no decurso do ensaio. O pH deve oscilar entre 6,0 e 8,5 no início do ensaio, embora, no decurso do mesmo, a respetiva variação não deva exceder ± 0,5. De modo a assegurar que a água de diluição não influencie indevidamente o resultado (por complexação da substância em estudo, por exemplo) ou afete de forma desfavorável o desempenho do lote de peixes, deverão ser retiradas amostras regularmente para análise, pelo menos no início e no final do ensaio. Deve determinar-se o teor de metais pesados (Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni, por exemplo), dos principais aniões e catiões (Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, e SO_4^{2-} etc.), de pesticidas (pesticidas organofosforados totais, pesticidas organoclorados totais, etc.), de carbono orgânico total e de sólidos em suspensão. Se a qualidade da água de diluição se mantiver relativamente constante, estas medições podem realizar-se, por exemplo, de três em três meses. Caso se demonstre que a qualidade da água de diluição se mantém inalterada durante, pelo menos, um ano, as determinações podem ser menos frequentes (de seis em seis meses, por exemplo).

O teor de partículas naturais, bem como de carbono orgânico total, da água de diluição deve ser tão reduzido quanto possível, de modo a evitar a adsorção de substância em estudo pela matéria orgânica, o que pode reduzir a sua biodisponibilidade e resultar numa subestimação do BCF. O valor máximo aceitável é de 5 mg/l, no caso das partículas (matérias secas que não passem através de um filtro de 0,45 μm) e 2 mg/l, no caso do carbono orgânico total (*cf.* apêndice 2).

([1]) O COT inclui o carbono orgânico das partículas e o carbono orgânico dissolvido, *ou seja,* COT = COP + COD.

▼M7

Se necessário, a água de diluição deverá ser filtrada antes do uso. A contribuição das excreções dos peixes e dos resíduos alimentares para o teor de carbono orgânico total na água de ensaio deve manter-se tão reduzida quanto possível (*cf.* ponto 46).

Soluções de ensaio

Deve preparar-se uma solução de reserva da substância em estudo com uma concentração adequada. De preferência, a solução de reserva deve ser preparada simplesmente por mistura ou agitação da substância em estudo na água de diluição. Uma alternativa que pode ser adequada em alguns casos é a utilização de um sistema de dosagem de dessorção em fase sólida. Em geral, não se recomenda a utilização de solventes e dispersantes (agentes solubilizantes) (*cf.* (25); todavia, a utilização destes materiais pode ser aceitável para produzir uma solução de reserva com uma concentração adequada, mas devem envidar-se todos os esforços para minimizar a utilização destes materiais e não se deve ultrapassar a sua concentração micelar crítica (se relevante). A acetona, o etanol, o metanol, a dimetilformamida e o trietilenoglicol constituem alguns dos solventes que podem ser utilizados; os dispersantes cuja utilização está documentada são o Tween 80, a metilcelulose 0,01 % e o HCO-40. A concentração do solvente no meio de ensaio final deve ser idêntica em todos os procedimentos (ou seja, independentemente da concentração da substância em estudo) e não deve exceder os limiares de toxicidade correspondentes determinados para o solvente no âmbito das condições de ensaio. A concentração máxima é de 100 mg/l (ou 0,1 ml/l). É pouco provável que uma concentração de 100 mg/l de solvente altere significativamente a concentração máxima dissolvida da substância em estudo que pode ser alcançada no meio (25). Deve conhecer-se a contribuição do solvente (juntamente com a substância em estudo) para o teor de carbono orgânico total da água. No decurso do ensaio, a concentração de carbono orgânico total nos recipientes não deve exceder a concentração de carbono orgânico proveniente da substância em estudo e do solvente ou agente de solubilização ([1]) — se utilizado — em mais de 10 mg/l (± 20 %). O teor de matéria orgânica pode ter um efeito significativo sobre a quantidade de substância em estudo livremente dissolvida durante os ensaios dinâmicos com peixes, especialmente no que se refere às substâncias muito lipófilas. A microextração em fase sólida (*cf.* ponto 60) pode fornecer informações importantes sobre a razão entre as substâncias ligadas e livremente dissolvidas, partindo-se do princípio de que esta última representa a fração biodisponível. A concentração da substância em estudo deve ser inferior ao limite de solubilidade da substância nos meios de ensaio, não obstante a utilização de um solvente ou agente de solubilização. Os solventes que apresentem biodegradabilidade fácil devem utilizar-se com precaução, uma vez que podem originar problemas de crescimento bacteriano nos ensaios dinâmicos. Caso não seja possível preparar uma solução de reserva sem a utilização de um agente de solubilização, é necessário ponderar a adequação de um estudo de exposição aquosa ao invés de um estudo de exposição por via alimentar.

Nos ensaios dinâmicos, é necessário utilizar um sistema que distribua e dilua continuamente uma solução de reserva da substância em estudo (uma bomba de medição, um diluidor proporcional, um sistema saturador, por exemplo), ou um sistema de dosagem de dessorção em fase sólida, por forma a fornecer as concentrações às células de ensaio. De preferência, devem efetuar-se diariamente pelo menos cinco renovações do volume de cada célula de ensaio. Em princípio, devem utilizar-se condições dinâmicas; todavia, se tal não se afigurar possível (por exemplo, caso os organismos sejam afetados) pode recorrer-se a uma técnica semiestática, na condição de serem satisfeitos os critérios de validade (*cf.* ponto 24). Os caudais da solução de reserva e da água de diluição devem ser verificados 48 horas antes do início do ensaio e com uma frequência pelo menos diária no decurso do mesmo. A referida verificação inclui a determinação do caudal em cada célula de ensaio, devendo assegurar-se que o mesmo não regista uma variação superior a 20 % num determinada célula ou entre duas células.

([1]) Embora em geral não se recomende, caso se utilize um solvente ou um agente de solubilização, o carbono orgânico decorrente deste agente deve ser adicionado ao carbono orgânico da substância em estudo para avaliar a concentração de carbono orgânico nos recipientes de ensaio.

▼M7

Seleção das espécies

Os principais critérios de seleção das espécies consistem na sua fácil disponibilidade, nas dimensões adequadas e na facilidade de manutenção no laboratório. Outros critérios incluem o interesse recreativo e comercial e a importância ecológica, bem como a sensibilidade comparável, utilizações anteriores bem-sucedidas, etc. As espécies de ensaio recomendadas constam do apêndice 3. Podem utilizar-se outras espécies, devendo, contudo, adaptar-se os procedimentos de modo a obter condições de ensaio adequadas. Neste caso, o critério para a seleção das espécies e o método experimental deverão ser indicados no relatório. Em geral, a utilização de espécies de peixes de menor dimensão antecipará o surgimento do estado estacionário, mas pode ser necessário utilizar um número superior de peixes (amostras) para analisar de modo adequado o teor de lípidos e as concentrações da substância em estudo nos peixes. Além disso, é possível que as diferenças na frequência respiratória e no metabolismo entre peixes jovens e mais velhos dificultem a comparação de resultados entre diferentes ensaios e espécies. Importa salientar que as espécies de peixes ensaiadas durante uma fase da vida (juvenil) com crescimento rápido podem complicar a interpretação dos dados.

Confinamento dos peixes (relevante para exposição aquosa e por via alimentar)

A população de reserva deve ser aclimatada durante, pelo menos, duas semanas em água (*cf.* ponto 28) à temperatura de ensaio, sendo alimentada com uma dieta suficiente (*cf.* ponto 45). A água e a dieta devem ser do mesmo tipo que as utilizadas durante o ensaio.

Após um período de adaptação de 48 horas, regista-se a mortalidade, aplicando os seguintes critérios:

— mortalidade superior a 10 % da população em sete dias: o lote é rejeitado na sua totalidade;

— mortalidade entre 5 % e 10 % da população em sete dias: aclimatar durante sete dias adicionais — caso se verifique uma mortalidade superior a 5 % durante o segundo período de sete dias, o lote é rejeitado na sua totalidade;

— mortalidade inferior a 5 % da população em sete dias: o lote é aceite.

Os animais a utilizar nos ensaios não devem apresentar doenças ou perturbações observáveis. Todos os peixes doentes devem ser rejeitados. Os peixes não devem receber qualquer tratamento para doenças nas duas semanas anteriores ao ensaio nem durante a realização do mesmo.

REALIZAÇÃO DO ENSAIO

Teste preliminar

Poderá ser útil efetuar um ensaio preliminar com o objetivo de otimizar as condições do ensaio definitivo no que respeita, nomeadamente, à seleção da concentração da substância em estudo e à duração das fases de fixação e de depuração, ou para determinar se será necessário realizar um ensaio completo. A conceção do ensaio preliminar deve conduzir à obtenção das informações necessárias. É possível analisar se um ensaio minimizado será suficiente para obter um BCF, ou se é necessário um estudo completo (*cf.* pontos 83-95, relativos ao ensaio minimizado).

Condições de exposição

Duração da fase de fixação

Pode obter-se uma estimativa da duração da fase de fixação com base na experiência prática (por exemplo, dados decorrentes de um estudo anterior ou um estudo de acumulação com uma substância estruturalmente relacionada), bem como em determinadas relações empíricas que utilizam conhecimentos relativos à solubilidade da substância em água ou ao respetivo coeficiente de partição octanol/água (desde que essa fixação siga uma cinética de primeira ordem *cf.* apêndice 5).

▼M7

A fase de fixação deve durar, pelo menos, 28 dias, exceto se o estado estacionário for atingido antes (ver apêndice 1, definições e unidades). Um estado estacionário é atingido sempre que a representação gráfica da concentração da substância em estudo nos peixes (C_f) em função do tempo consista numa linha paralela ao eixo dos tempos e três determinações sucessivas de C_f em amostras recolhidas com intervalos de, pelo menos, dois dias, apresentem valores que não difiram em mais de 20 %, na ausência de aumento significativo de C_f entre a primeira e a última determinação sucessivas. No caso das amostras combinadas, são necessárias, pelo menos, quatro determinações. No caso de substâncias cuja fixação é lenta, o intervalo mais adequado é de sete dias. Caso não se atinja o estado estacionário no prazo de 28 dias, deve calcular-se o BCF utilizando apenas o método cinético, que não depende do surgimento do estado estacionário; é possível prolongar a fase de fixação, fazendo medições adicionais, até ao surgimento do estado estacionário ou durante 60 dias, conforme o que for mais curto. Além disso, a concentração da substância em estudo nos peixes no final da fase de fixação deve ser suficientemente elevada para garantir uma estimativa fiável de k_2 a partir da fase de depuração. Caso não se verifique uma fixação significativa após 28 dias, é possível interromper o ensaio.

Duração da fase de depuração

No que diz respeito às substâncias que seguem uma cinética de primeira ordem, basta, em geral, um período com uma duração de metade da fase de fixação para uma redução adequada (isto é, cerca de 95 %) da carga corporal da substância em estudo (*cf.* apêndice 5 para uma especificação da estimativa). Se o período necessário para a referida redução de 95 % exibir uma extensão que o torne impraticável, excedendo, por exemplo, o dobro da duração normal da fase de fixação (*ou seja,* mais de 56 dias), pode utilizar-se um período mais curto (por exemplo, até que a concentração da substância em estudo seja inferior a 10 % da concentração do estado estacionário). Todavia, no caso de substâncias com perfis de fixação e de depuração mais complexos, podem ser necessários períodos de depuração mais longos do que no caso de modelos com uma cinética de primeira ordem. Se se observarem e/ou previrem esses perfis complexos, recomenda-se que se solicite o parecer de um perito em bioestatística e/ou farmacocinética para garantir uma instalação de ensaio adequada. À medida que o período de depuração se prolonga, o número de peixes a recolher para amostra pode tornar-se limitador e as diferenças de crescimento entre os peixes podem influenciar os resultados. O período em causa também será definido pelo período durante o qual a concentração da substância em estudo nos peixes permanece superior ao limite analítico de quantificação.

Número de peixes

O número de peixes a utilizar por concentração de ensaio deve ser selecionado de forma a que se disponha de, pelo menos, quatro animais por ponto de amostragem. Os peixes só devem ser agrupados se a análise de um único peixe não for exequível. Caso se pretenda uma precisão mais elevada no ajustamento das curvas (e dos parâmetros derivados), ou se forem necessários estudos do metabolismo — p. ex., para distinguir entre metabolitos e substância de origem em caso de utilização de substâncias com marcação radioativa —, serão necessários mais peixes por ponto de amostragem. Deve determinar-se o teor de lípidos do material biológico utilizado para determinar a concentração da substância em estudo. Se tal não for possível, podem ser necessários peixes adicionais (*cf.* pontos 56 e 57).

Caso se utilizem peixes adultos (*ou seja,* que atingiram a maturidade sexual), estes não se devem encontrar num estado de desova ou recentemente desovados, quer antes quer durante o ensaio. Deve especificar-se ainda o sexo utilizado. Caso se utilizem ambos os sexos, deve registar-se que as diferenças no crescimento e no teor de lípidos entre sexos não são significativas antes do início da exposição, nomeadamente caso se preveja que será necessário o agrupamento de peixes de ambos os sexos para garantir um teor de lípidos e/ou concentrações detetáveis da substância.

▼M7

Em qualquer ensaio, selecionam-se peixes de massa semelhante, de modo que a massa do mais leve não seja inferior a 2/3 da massa do mais pesado. Os peixes devem ser da mesma coorte (classe etária) e da mesma proveniência. Uma vez que a massa e a idade dos peixes podem apresentar um efeito significativo nos valores do BCF (12), esses dados devem registar-se de forma precisa. Recomenda-se a pesagem de uma amostra do lote de peixes pouco antes do início do ensaio, de modo a calcular a massa média (*cf.* ponto 61).

Carga

Devem utilizar-se rácios elevados água/peixes, de modo a minimizar a redução da concentração da substância em estudo na água, provocada pela introdução dos peixes no início do ensaio, bem como a evitar o decréscimo da concentração do oxigénio dissolvido. A taxa de carga deve ser adequada às espécies utilizadas. Recomenda-se, em geral, uma taxa diária peixes/água de 0,1 a 1,0 g de peixes (massa húmida) por litro de água. Caso a concentração requerida da substância em estudo não registe uma variação superior a ± 20 % e a quantidade de oxigénio dissolvido não atinja valores inferiores a 60 % da concentração de saturação, podem utilizar-se taxas de carga peixes/água mais elevadas (*cf.* ponto 24).

Na seleção dos regimes de carga adequados deve ter-se em conta o habitat normal das espécies em causa. Por exemplo, as espécies bentónicas necessitam de aquários com maior área de base em comparação com as espécies pelágicas, para o mesmo volume de água.

Alimentação

Durante os períodos de aclimatação e de ensaio, os peixes são alimentados com uma dieta adequada, com teor total de lípidos e de proteínas conhecido, numa quantidade suficiente para mantê-los em condições saudáveis e manter constante a respetiva massa corporal (é permitido algum crescimento). Os peixes devem ser alimentados diariamente durante os períodos de aclimatação e de ensaio a um nível definido em função da espécie utilizada, das condições experimentais e do valor calórico dos alimentos (por exemplo, para as trutas-arco-íris entre aproximadamente 1 % e 2 % da massa corporal por dia). A taxa de alimentação deve ser selecionada de modo a evitar o crescimento rápido e um grande aumento do teor de lípidos. Para manter a mesma taxa de alimentação, deve recalcular-se a quantidade de alimentos conforme adequado, por exemplo, uma vez por semana. Para tal, pode estimar-se a massa dos peixes de cada célula de ensaio com base na massa do peixe mais recentemente retirado da mesma. Não devem pesar-se os peixes que permanecem na célula.

Os alimentos remanescentes e as fezes devem ser removidos diariamente dos células de ensaio, 30 minutos a 1 hora após o fornecimento dos alimentos. As células devem manter-se tão limpas quanto possível ao longo do ensaio, de modo a que a concentração de matérias orgânicas seja mantida aos níveis mais reduzidos (*cf.* ponto 29), uma vez que a presença de carbono orgânico pode limitar a biodisponibilidade da substância em estudo (12).

Uma vez que muitos alimentos contêm ingredientes à base de peixe, deve garantir-se que estes não influenciarão os resultados do ensaio nem provocarão efeitos adversos — por exemplo, por conterem vestígios de pesticidas, metais pesados e/ou a própria substância em estudo.

Luz e temperatura

Recomenda-se um fotoperíodo de 12 a 16 horas e a temperatura (± 2 °C) deve ser adequada à espécie em estudo (*cf.* apêndice 3). Devem conhecer-se o tipo e as características da iluminação. Deve atender-se à eventual fototransformação da substância em estudo nas condições de irradiação do ensaio. Devem utilizar-se fontes de iluminação adequadas, de modo a evitar a exposição dos animais a produtos de fotólise não naturais. Em alguns casos, pode afigurar-se adequado utilizar um filtro que elimine as radiações ultravioletas de comprimento de onda inferior a 290 nm.

▼M7

Concentrações de ensaio

O ensaio foi originalmente concebido para substâncias orgânicas não polares. No que diz respeito a este tipo de substância, prevê-se que a exposição dos peixes a um valor único de concentração seja suficiente, já que não se preveem efeitos da concentração, embora o quadro regulamentar aplicável possa exigir duas concentrações. Caso sejam ensaiadas substâncias não abrangidas por esta gama, ou sejam conhecidas outras indicações de possível dependência da concentração, o ensaio deve ser realizado com duas ou mais concentrações. Caso se utilize apenas uma concentração, é necessário fundamentar esse facto (*cf.* ponto 79). Além disso, a concentração ensaiada deve ser a mais reduzida possível em termos práticos ou técnicos (*ou seja,* sem proximidade ao limite de solubilidade).

Em alguns casos, pode prever-se que a bioconcentração de uma substância seja dependente da concentração da água (por exemplo, no respeitante aos metais, cuja fixação pelos peixes pode ser, pelo menos, parcialmente regulada). Neste caso, é necessário ensaiar pelo menos duas, mas de preferência mais, concentrações (*cf.* ponto 49) relevantes do ponto de vista ambiental. Também para as substâncias cujas concentrações ensaiadas devem estar próximas do limite de solubilidade por motivos práticos, recomenda-se o ensaio de, pelo menos, duas concentrações, pois tal pode contribuir para determinar a fiabilidade das concentrações de exposição. A escolha das concentrações de ensaio deve englobar a concentração realista em termos ambientais, bem como a concentração relevante para efeitos da avaliação específica.

A concentração ou concentrações da substância em estudo selecionadas devem ser inferiores ao seu nível de efeito crónico ou 1 % da concentração LC_{50} aguda assintótica, num intervalo relevante do ponto de vista ambiental e ocorrer, pelo menos, numa ordem de grandeza superior ao seu limite de quantificação em água pelo método analítico utilizado. A concentração de ensaio mais elevada permitida pode também ser calculada através do quociente de LC_{50} aguda às 96 horas por um rácio de concentração aguda/crónica adequado (por exemplo, os rácios adequados a determinadas substâncias são cerca de três, mas alguns são superiores a 100). Caso se utilize uma segunda concentração, esta deve diferir da anterior por um fator de dez. Caso tal não seja possível devido ao critério de toxicidade (que limita a concentração superior do ensaio) e ao limite analítico (que limita a concentração inferior do ensaio), é possível utilizar um fator inferior a dez e deve ponderar-se a utilização de uma substância com marcação radioativa (de uma grau de pureza elevado, por exemplo, de preferência superior a 98 %). Deve ter-se o cuidado de evitar que a concentração utilizada seja superior ao limite de solubilidade da substância em estudo nos meios de ensaio.

Controlos

Deve realizar-se um controlo de água de diluição ou, se relevante, (*cf.* pontos 30 e 31), um controlo com o solvente, para além da série em ensaio.

Frequência das determinações da qualidade da água

Durante o ensaio, devem determinar-se, em todos os recipientes de ensaio e de controlo, o oxigénio dissolvido, o carbono orgânico total, o pH e a temperatura. A dureza total e a salinidade (se pertinente) devem ser medidas no(s) controlo(s) e num recipiente. Caso sejam ensaiadas duas ou mais concentrações, devem medir-se estes parâmetros numa concentração mais elevada (ou na mais elevada). O oxigénio dissolvido e — se for caso disso — a salinidade devem ser determinados, no mínimo, três vezes durante o período de fixação (no início, na fase intermédia e no final) e com uma frequência semanal no decurso da fase de depuração. O carbono orgânico total deve ser determinado no início do ensaio (48 h e 24 h antes do início), antes da colocação dos peixes nos recipientes e, pelo menos, uma vez por semana no decurso das fases de fixação e de depuração. Deve determinar-se e registar-se a temperatura diariamente, o pH no início e no final de cada período e a dureza uma vez em cada ensaio. Deve determinar-se a temperatura, em contínuo, pelo menos num dos recipientes.

▼M7

Amostragem e análise dos peixes e da água

Calendário da recolha de amostras de peixes e de água

Devem recolher-se amostras de água para a determinação da concentração da substância em estudo antes da colocação dos peixes nas células, bem como no decurso das fases de fixação e de depuração. Devem recolher-se amostras da água antes da alimentação, em simultâneo com a recolha de amostras de peixes. A recolha de amostras mais frequente pode ser útil para garantir concentrações estáveis após a introdução dos peixes. Durante a fase de fixação, as concentrações da substância em estudo devem ser determinadas de modo a verificar o respeito dos critérios de validade (ponto 24). Caso as análises às amostras de água no início da fase de depuração demonstrem que a substância em estudo não é detetável, isso pode ser utilizado como justificação para não averiguar a ocorrência da substância em estudo na água de controlo e de ensaio durante a restante fase de depuração.

Os peixes devem ser recolhidos em, pelo menos, cinco ocasiões no decurso da fase de fixação e em, pelo menos, quatro ocasiões durante a fase de depuração para averiguar a presença da substância em estudo. Uma vez que, por vezes, se torna difícil efetuar uma estimativa razoavelmente precisa do BCF com base no número de amostras (em especial no caso de a depuração envolver processos que não apresentem uma cinética de primeira ordem nas fases de fixação e depuração) é aconselhável recolher amostras com uma frequência superior, em ambos os períodos (*cf.* apêndice 4).

Deve determinar-se o teor de lípidos do material biológico utilizado para determinar a concentração da substância em estudo pelo menos no início e no final da fase de fixação e no final da fase de depuração. Caso isto não seja possível, devem recolher-se pelo menos três peixes independentes para amostra, de modo a determinar o teor de lípidos, em cada uma dessas três ocasiões. O número de peixes por tanque no início da experiência deve ser ajustado em conformidade ([1]). Em alternativa, caso não se detetem quantidades significativas da substância em estudo nos peixes do lote de controlo (*ou seja,* peixes da população de reserva), os peixes do lote de controlo do ensaio podem ser analisados apenas no que respeita ao teor de lípidos, podendo a análise da substância em estudo no(s) grupo(s) de ensaio (e a constante de velocidade de fixação, a constante de velocidade de depuração e os valores BCF conexos) ser corrigida em função das alterações de acordo com o teor de lípidos do grupo de controlo durante o ensaio ([2]).

Não se deve analisar a ocorrência da substância em estudo nem a concentração de lípidos nos peixes mortos ou doentes.

O apêndice 4 apresenta um exemplo de calendário de amostragem. Podem elaborar-se outros calendários mediante a utilização de outros valores do K_{OW} para o cálculo do tempo de exposição necessário a uma fixação de 95 % (consultar o apêndice 5 para cálculos).

Deve prosseguir-se a recolha de amostras durante a fase de fixação até ao surgimento do estado estacionário (ver apêndice 1, definições e unidades) ou à conclusão da fase de fixação (após 28 ou 60 dias, *cf.* pontos 37 e 38). Antes do início da fase de depuração, os peixes devem ser transferidos para recipientes limpos.

Colheita e preparação das amostras

Devem recolher-se amostras de água para análise, por exemplo, por bombagem através de tubos inertes, a partir de um ponto central na célula de ensaio. No entanto, a centrifugação e a filtração parecem nem sempre separar a fração não

([1]) Caso o teor de lípidos e a substância em estudo não seja analisados nos mesmos peixes, os peixes devem, pelo menos, apresentar uma massa semelhante e (se pertinente) o mesmo sexo.

([2]) Esta alternativa é válida apenas se os peixes em todos os grupos de ensaio forem mantidos em grupos com dimensões semelhantes, se os peixes forem removidos de acordo com o mesmo perfil e alimentados da mesma forma. O que precede assegura que o crescimento dos peixes em todos os grupos de ensaio é semelhante, caso a concentração de ensaio seja inferior ao intervalo tóxico. Se o crescimento for semelhante, espera-se que o teor de lípidos seja igualmente semelhante. Um crescimento diferente no controlo indicaria um efeito da substância e invalidaria o estudo.

▼M7

biodisponível da fração biodisponível da substância em estudo. Caso se utilize uma técnica de separação, deve apresentar-se sempre uma justificação ou uma validação da mesma no relatório de ensaio, atendendo às dificuldades em matéria de biodisponibilidade (25). Especialmente no que diz respeito às substâncias muito hidrófobas (*ou seja,* as substâncias com log K_{OW} > 5) (12) (26), cuja adsorção à matriz de filtragem ou aos recipientes de centrifugação é possível, as amostras não devem ser submetidas a esses tratamentos. Em vez disso, devem adotar-se medidas para manter as células tão limpas quanto possível (*cf.* ponto 46) e determinar-se o teor de carbono orgânico total nas fases de fixação e de depuração (*cf.* ponto 53). Para evitar possíveis problemas com biodisponibilidade reduzida, pode proceder-se à recolha de amostras por técnicas de microextração em fase sólida, no respeitante às substâncias pouco solúveis e muito hidrófobas.

Os peixes recolhidos para amostra devem ser eutanasiados instantaneamente, recorrendo ao método mais adequado e humano (para medições com peixes inteiros, não se devem utilizar outros processos que não o enxaguamento com água — *cf.* ponto 28 — e a secagem). Deve proceder-se à pesagem e medição do comprimento total ([1]). Em cada peixe individual, o peso e o comprimento determinados devem ser relacionados com a concentração da substância analisada (e o teor de lípidos, se aplicável), por exemplo, através de um código de identificação único para cada peixe recolhido.

É aconselhável analisar os peixes e a água imediatamente após a recolha das amostras, de modo a evitar eventuais efeitos, nomeadamente devidos à degradação, calculando as constantes de velocidade de fixação e de depuração aproximadas em função do avanço do ensaio. A análise imediata permite também identificar prontamente o início de um estado estacionário.

Caso não se proceda à análise imediata, as amostras devem ser armazenadas por um método adequado. Antes do início do estudo, devem obter-se informações sobre o método adequado de armazenagem da substância em estudo — por exemplo, ultracongelação, armazenagem a 4 °C, extração, etc. Deve estabelecer-se a duração da armazenagem para garantir que a substância não se degradou durante a mesma.

Qualidade do método analítico

Uma vez que o processo global é determinado essencialmente pela exatidão, precisão e sensibilidade do método analítico utilizado, deve comprovar-se experimentalmente a adequação àquele da exatidão, precisão e reprodutibilidade deste último, bem como do método de recolha da substância em estudo a partir da água e dos peixes. Tal deve ser parte constituinte dos testes preliminares. Deve também comprovar-se que a substância em estudo não é detetável na água de diluição. Se necessário, devem corrigir-se os valores da concentração da substância em estudo na água e nos peixes obtidos a partir do ensaio, em função das recuperações e dos valores de fundo dos controlos. As amostras de peixes e de água devem ser manipuladas de modo a minimizar contaminações e perdas, resultantes, nomeadamente, da adsorção pelos equipamentos de amostragem.

Análise das amostras de peixes

Caso se utilizem materiais com marcação radioativa, pode determinar-se a radioatividade total (*isto é*, da substância de origem e dos seus metabolitos) ou, como alternativa, tratar as amostras de modo a que a substância de origem possa ser analisada separadamente. Caso se calcule o BCF com base na substância de origem, devem caracterizar-se os principais metabolitos, no mínimo, no final da fase de fixação (*cf.* ponto 6). Os principais metabolitos são os que representam ≥ 10 % dos resíduos totais nos tecidos dos peixes, os que representam ≥ 5 % em dois pontos de amostragem consecutivos, os que demonstram níveis crescentes ao longo da fase de fixação e os de risco toxicológico conhecido. Caso o BCF para o peixe inteiro em termos de resíduos totais com marcação radioativa

([1]) Para além do peso, deve registar-se o comprimento total, já que a comparação do grau de aumento do comprimento durante o ensaio constitui um bom indicador da ocorrência de um efeito adverso.

▼M7

seja ≥ 500, pode ser recomendável — e, no que se refere a determinadas categorias de substâncias, como pesticidas, muito recomendável — identificar e quantificar os principais metabolitos. A quantificação destes metabolitos pode ser exigida por algumas entidades reguladoras. Caso se identifiquem e quantifiquem produtos de degradação que representem 10 % ou mais dos resíduos totais com marcação radioativa nos tecidos dos peixes, recomenda-se também a identificação e quantificação dos produtos de degradação na água do ensaio. Caso tal não seja possível, deve ser explicado no relatório.

Em geral, deve determinar-se a concentração da substância em estudo para cada peixe pesado. Se tal não for possível, podem combinar-se as amostras em cada amostragem, mas esta combinação limita os procedimentos estatísticos aplicáveis aos dados, pelo que se deve incluir no ensaio um número adequado de peixes para fazer face à combinação, ao procedimento estatístico e à potência desejados. É possível utilizar as referências (27) e (28) como introdução aos procedimentos de combinação pertinentes.

O BCF deve ser expresso, de forma normalizada, em relação a um peixe com um teor de lípidos de 5 % (com base na massa húmida) para além do obtido diretamente a partir do estudo (*cf.* ponto 21), a menos que seja possível argumentar que a substância em estudo não se acumula principalmente nos lípidos. Se possível, deve determinar-se o teor de lípidos dos peixes em cada amostragem, de preferência no extrato utilizado para a análise da substância em estudo, uma vez que, com frequência, é necessário remover os lípidos do extrato antes da análise cromatográfica deste último. Porém, a análise das substâncias em estudo exige muitas vezes procedimentos de extração específicos que podem não ser compatíveis com os métodos de ensaio para a determinação dos lípidos. Neste caso — até que se encontrem disponíveis métodos instrumentais não destrutivos adequados —, recomenda-se a utilização de uma estratégia diferente para determinar o teor de lípidos dos peixes (*cf.* ponto 56). O teor de lípidos deve ser determinado por métodos adequados (20). Como método-padrão (30), pode recomendar-se a extração com clorofórmio/metanol (29), recomendando-se, porém, o método de Smedes (31) como alternativa. Este último método é caracterizado por uma eficiência de extração comparável, elevada exatidão, utilização de solventes orgânicos menos tóxicos e facilidade de execução. Com justificação adequada, podem utilizar-se outros métodos cuja exatidão seja favorável em comparação com os métodos recomendados. É importante apresentar pormenores sobre o método utilizado.

Determinação do crescimento dos peixes

No início do ensaio, é necessário pesar individualmente e determinar o comprimento total de cinco a dez peixes da população de reserva. Estes podem ser os peixes utilizados para a análise aos lípidos (*cf.* ponto 56). O peso e o comprimento dos peixes utilizados em cada colheita de amostra, tanto do grupo de ensaio como do grupo de controlo, devem ser determinados antes da análise da substância em estudo ou dos lípidos. As medições destes peixes recolhidos podem ser utilizadas para estimar o peso e o comprimento dos peixes que permanecem nos tanques de ensaio e de controlo (*cf.* ponto 45).

DADOS E RELATÓRIOS

Tratamento dos resultados

A curva de fixação da substância em estudo deve ser obtida através da representação gráfica da respetiva concentração nos peixes ou em determinados tecidos dos mesmos na fase de fixação, em função do tempo, numa escala aritmética. Quando se observar o início do estado estacionário, isto é, quando a curva se tornar aproximadamente assintótica relativamente ao eixo dos tempos, deve calcular-se o BCF (BCF_{SS}) do seguinte modo:

$$\frac{C_f \text{no estado estacionário}(\text{média})}{C_w \text{no estado estacionário}(\text{média})}$$

▼M7

O desenvolvimento de C_f pode ser influenciado pelo crescimento dos peixes (*cf.* pontos 72 e 73). A concentração de exposição média (C_w) é influenciada por variações ao longo do tempo. É possível prever que uma concentração média ponderada no tempo seja mais relevante e precisa para estudos de bioacumulação, mesmo que a variação se encontre dentro do intervalo de validade adequado (*cf.* n. 24). É possível calcular a concentração média da água ponderada ao longo do tempo (TWA) em conformidade com o apêndice 5, secção 1.

O fator de bioconcentração cinético (BCF_K) consiste no quociente das duas constantes de velocidade cinéticas de primeira ordem, k_1/k_2. É possível obter as constantes de velocidade k_1 e k_2 e o BCF_K através do ajustamento simultâneo das fases de fixação e de depuração. Em alternativa, as constantes k_1 e k_2 podem ser determinadas sequencialmente (ver apêndice 5 para uma descrição e comparação destes métodos). Pode ser necessário corrigir a constante de velocidade de depuração (k_2) em função da diluição de crescimento (*cf.* pontos 72 e 73). Se a curva de fixação e/ou depuração revelar de modo inequívoco que o processo não segue uma cinética de primeira ordem, há que recorrer a modelos mais complexos (ver referências no apêndice 5), solicitando o parecer de um perito em bioestatística ou farmacocinética.

Dados sobre o peso/comprimento dos peixes

A massa húmida e o comprimento total de cada peixe em todos os intervalos de amostragem são apresentados separadamente sob a forma de um quadro, no respeitante aos grupos de ensaio e de controlo durante as fases de fixação (incluindo a população de reserva no início da fixação) e de depuração. Em cada peixe individual, o peso e o comprimento determinados devem ser relacionados com a concentração química analisada, por exemplo, através de um código de identificação único para cada peixe recolhido. O peso é a medida de crescimento preferível para efeitos de correção dos valores do BCF cinético em função da diluição de crescimento (ver o ponto 73 e o apêndice 5 no respeitante ao método utilizado para corrigir os dados em função da diluição de crescimento).

Correção em função da diluição de crescimento e normalização de lípidos

O crescimento dos peixes durante a fase de depuração pode reduzir as concentrações químicas medidas nos peixes, tornando a constante de velocidade de depuração global (k_2) superior à que se verificaria apenas nos processos de remoção (por exemplo, respiração, metabolismo, defecação). Os fatores de bioconcentração cinéticos devem ser corrigidos em função da diluição de crescimento. Um BCF_{SS} também será influenciado pelo crescimento, mas não existe nenhum procedimento acordado para corrigir um BCF_{SS} em função do crescimento. Nos casos de crescimento significativo, também se deve calcular o BCF_K, corrigido em função do crescimento (BCF_{Kg}), uma vez que pode ser uma determinação mais relevante do fator de bioconcentração. Na prática, o teor de lípidos dos peixes de ensaio (que se encontra fortemente associado à bioacumulação de substâncias hidrófobas) pode variar o suficiente para tornar necessário o estabelecimento de um determinado teor de lípidos normalizado nos peixes (5 % p/p), de modo a apresentar os fatores de bioconcentração cinéticos e no estado estacionário de forma significativa, a menos que seja possível alegar que a substância em estudo não se acumula sobretudo nos lípidos (por exemplo, algumas substâncias perfluoradas pode ligar-se às proteínas). O apêndice 5 apresenta equações e exemplos destes cálculos.

Para corrigir um BCF cinético em função da diluição de crescimento, deve corrigir-se a constante de velocidade de depuração em função do crescimento. A constante corrigida (k_{2g}) é calculada através da subtração da constante de velocidade de crescimento (k_g, obtida a partir dos dados relativos ao peso determinado) à constante de velocidade de depuração global (k_2). O fator de bioconcentração cinético corrigido em função do crescimento é posteriormente calculado dividindo a constante de velocidade de fixação (k_1) pela constante de velocidade de depuração corrigida em função do crescimento (k_{2g}) (*cf.* apêndice 5). Em alguns casos, esta metodologia não é muito adequada. Por exemplo, no que

▼M7

diz respeito às substâncias que depuram muito lentamente, ensaiadas em peixes de crescimento rápido, o valor k_{2g} obtido pode ser muito reduzido e, deste modo, o erro nas duas constantes de velocidade utilizadas para o seu cálculo torna-se crítico e, em alguns casos, as estimativas do valor kg podem ser superiores a k_2. Uma metodologia alternativa, que contorna a necessidade da correção em função da diluição de crescimento, implica a utilização de dados de depuração relativos à massa da substância em estudo por peixe (com base no peixe inteiro), ao invés dos dados (de concentração) relativos à massa normal da substância em estudo por unidade de massa de peixe. Isso não apresenta dificuldades, uma vez que os ensaios realizados por este método devem relacionar as concentrações registadas nos tecidos com o peso de cada peixe. O procedimento simples para realizar o que precede encontra-se descrito no apêndice 5. Todavia, importa salientar a necessidade de registar o parâmetro k_2 mesmo em caso de utilização desta metodologia alternativa.

Também se devem registar os fatores de bioconcentração cinéticos e no estado estacionário relativos a um teor de lípidos por defeito, por peixe, de 5 % (p/p), a menos que seja possível argumentar que a substância em estudo não se acumula essencialmente nos lípidos. Os dados relativos à concentração nos peixes, ou o BCF, são normalizados de acordo com a razão entre 5 % e o teor médio de lípidos (individual) real (em % de massa húmida) (*cf.* apêndice 5).

Caso se tenham realizado análises à substância em estudo e aos lípidos nos mesmos peixes, devem utilizar-se os dados normalizados relativos aos lípidos para cada peixe para calcular um BCF normalizado em função dos lípidos. Em alternativa, se o crescimento no lote de peixes de controlo e no lote de peixes expostos for semelhante, pode utilizar-se apenas o teor de lípidos dos peixes do lote de controlo para efeitos de correção em função dos lípidos (*cf.* ponto 56). Encontra-se descrito no apêndice 5 um método de cálculo de um BCF normalizado em função dos lípidos.

Interpretação dos resultados

Sempre que as concentrações das soluções de ensaio sejam próximas do limite de deteção do método analítico utilizado, os resultados devem ser interpretados com precaução.

Para excluir efeitos tóxicos, o crescimento médio nos grupos de ensaio e de controlo não deve, em princípio, ser significativamente diferente. As constantes de velocidade de crescimento ou as curvas de crescimento dos dois grupos devem ser comparadas por um procedimento adequado ([1]).

A obtenção de curvas de fixação e de depuração bem definidas constitui um indicador da qualidade dos dados relativos à bioconcentração. No que se refere às constantes de velocidade, o resultado de um teste de adequação do ajustamento χ^2 deve demonstrar um bom ajustamento — *ou seja,* uma percentagem reduzida de erro de medição (32) — para o modelo de bioacumulação, de modo a que as constantes de velocidade possam ser consideradas fiáveis (*cf.* apêndice 5). Caso se utilize mais do que uma concentração de ensaio, a variação nas constantes de fixação/depuração entre as concentrações de ensaio deve ser inferior a 20 % ([2]). Em caso negativo, poderá indicar-se a dependência da concentração. Devem registar-se as diferenças significativas observadas nas constantes de velocidade de fixação/depuração entre as concentrações de ensaio aplicadas e devem apresentar-se possíveis explicações. O intervalo de confiança de 95 % dos valores de BCF obtidos em estudos adequados é, em geral, da ordem de ± 20 % do BCF obtido.

Caso sejam ensaiadas duas ou mais concentrações, os resultados de ambas ou todas as concentrações são utilizados para examinar se os resultados são coerentes

([1]) É possível efetuar um teste *t* às constantes de velocidade de crescimento, de modo a determinar se o crescimento difere entre os grupos de ensaio e de controlo, ou um teste *F* em caso de análise da variância. Se necessário, é possível utilizar um teste *F* ou um teste de rácio da verosimilhança para ajudar na seleção do modelo de crescimento adequado (monografia da OCDE, 54, (32)).

([2]) Estas percentagens pressupõem que os métodos analíticos são fiáveis e que a semivida é < 14 dias. Se os métodos analíticos forem menos fiáveis ou a semivida aumentar (significativamente), estes números tornar-se-ão mais elevados.

▼M7

e para demonstrar se existe dependência da concentração. Caso se ensaie apenas uma concentração, com o objetivo de minimizar a utilização de animais e/ou de recursos, é necessário fundamentar esse facto.

O BCF_{SS} resultante é duvidoso se o BCF_K for significativamente mais elevado do que o BCF_{SS}, uma vez que tal pode indiciar que não se atingiu um estado estacionário ou que a diluição de crescimento e os processos de depuração não foram tidos em conta. Nos casos em que o parâmetro BCF_{SS} é muito superior a BCF_K, deve averiguar-se a ocorrência de erros no cálculo das constantes de velocidade de fixação e de depuração e proceder-se à sua reavaliação. O recurso a um processo de ajustamento diferente pode melhorar a estimativa do BCF_K (*cf.* apêndice 5).

Relatório de ensaio

Para além das informações sobre a substância em estudo indicadas no ponto 3, o relatório de ensaio deve incluir as seguintes informações:

Substância em estudo:

Natureza física e propriedades físico-químicas pertinentes;

— Dados de identificação química, tais como as denominações IUPAC ou CAS, número CAS, código SMILES ou INChI, fórmula estrutural, grau de pureza, identidade química das impurezas conforme adequado e possível na prática, etc. (incluindo o teor de carbono orgânico, se adequado).

— No que diz respeito às substâncias formadas por vários componentes e UVCB (substâncias de composição desconhecida ou variável, produtos de reação complexos e materiais biológicos), a descrição — na medida do possível — da identidade química de cada componente e, para cada um, a sua percentagem face à massa total da substância. Deve resumir-se de que modo o método analítico utilizado no ensaio reflete uma medida da concentração da substância; todos os procedimentos analíticos devem ser descritos, nomeadamente a exatidão do método, o seu limite de deteção e o limite de quantificação.

— Em caso de recurso à marcação radioativa, a posição do(s) átomo(s) substituído(s) e a percentagem de radioatividade associada às impurezas.

— Informações sobre a toxicidade da substância em estudo para os peixes (idealmente para a espécie de ensaio). A toxicidade deve ser registada como LC_{50} aguda às 96 horas e NOAEC e LOAEC de um estudo crónico (*ou seja*, um ensaio nas fases iniciais de vida ou um ensaio sobre o ciclo de vida completo, se disponível).

— Condições de armazenagem do produto químico ou da substância em estudo e estabilidade do mesmo, ou da mesma, nessas condições, caso se proceda à armazenagem antes da utilização.

Espécie de ensaio:

Denominação científica, variedade, origem, pré-tratamento eventual, aclimatação, idade, sexo (se pertinente), gama de dimensões (peso e comprimento), etc.

Condições de ensaio:

— Tipo de procedimento utilizado (por exemplo, ensaio dinâmico ou semiestático); estudo normal ou conceção minimizada, incluindo lógica subjacente e justificação.

— Tipo e características da iluminação utilizada e respetivo fotoperíodo.

— Conceção do ensaio (número e dimensões das células de ensaio, taxa de renovação do volume de água, taxa de carga, número de replicados, número de peixes por replicado, número de concentrações de ensaio, duração das fases de fixação e depuração, frequência de amostragem de peixes e de água).

▼M7

— Método de preparação das soluções de reserva e frequência de renovação (caso se utilize um solvente, deve fornecer-se a respetiva concentração, bem como a contribuição do mesmo para o teor de carbono orgânico da água), ou descrição do sistema de dosagem alternativo.

— Concentrações de ensaio nominais, média e desvio-padrão dos valores determinados nos recipientes de ensaio e método e frequência de obtenção dos mesmos.

— Fonte de água de diluição, descrição do eventual pré-tratamento desta última, resultados de quaisquer ensaios destinados a comprovar a adequação da água aos peixes e características da água: pH, dureza, temperatura, concentração de oxigénio dissolvido, cloro residual (se determinado), carbono orgânico total, sólidos em suspensão, salinidade (se adequado) e quaisquer outras determinações efetuadas.

— Qualidade da água nos recipientes de ensaio (pH, dureza, carbono orgânico total, temperatura e concentração de oxigénio dissolvido); métodos utilizados e frequência das medições.

— Informações pormenorizadas sobre a alimentação dos animais — p. ex., tipo de alimentos, origem e composição dos mesmos (se possível, apresentar, pelo menos, o respetivo teor de lípidos e proteínas), taxa de alimentação selecionada, quantidade fornecida e frequência;

— Informações sobre o tratamento das amostras de peixes e de água, incluindo pormenores relativos à preparação, armazenagem e extração, bem como métodos analíticos aplicados à substância em estudo e à determinação do teor de lípidos, incluindo a respetiva precisão.

— Métodos utilizados para a aleatorização do tratamento e distribuição dos peixes pelos recipientes de ensaio.

— Data de introdução dos organismos de ensaio nas soluções de ensaio e duração do ensaio.

— Descrição dos ensaios de determinação da gama de concentrações e resultados, se disponível.

Resultados:

— Resultados de quaisquer estudos preliminares efetuados.

— Mortalidade dos peixes do lote de controlo e dos peixes expostos à substância, bem como qualquer comportamento anormal observável.

— Informações sobre quaisquer efeitos adversos observados.

— Descrição completa de todos os procedimentos de análise química utilizados, nomeadamente limites de deteção e quantificação, variabilidade e recuperação.

— Teor de lípidos dos peixes, nomeadamente o método utilizado para a sua determinação e, se calculado, o fator de normalização em função dos lípidos (L_n, fator que expressa resultados relativos a um teor de lípidos dos peixes de 5 %).

— Quadro com os dados respeitantes ao peso — e ao comprimento — dos peixes, relacionados com as concentrações do produto químico (e o teor de lípidos, se pertinente) de cada peixe, para os grupos de controlo e de exposição (por exemplo, utilizando identificadores únicos para cada peixe recolhido) e cálculos relativos à(s) constante(s) de velocidade de crescimento obtida(s).

▼M7

— Quadros com dados sobre a concentração da substância em estudo nos peixes (C_f, relacionados com cada peixe) e na água (C_w), com valores médios para o grupo de ensaio e de controlo, desvio-padrão e gama, se adequado, para todos os tempos de amostragem (C_f expressa em mg/kg de massa húmida do corpo inteiro ou de tecidos especificados do mesmo, por exemplo, lípidos, e C_w em mg/l). Valores C_w relativos às séries de controlo (bem como as concentrações de fundo).

— Curvas — incluindo todos os dados determinados — que demonstrem o seguinte (se pertinente, as concentrações podem ser expressas em relação ao corpo inteiro e o teor de lípidos normalizado para 5 % do animal ou para determinados tecidos do mesmo):

  — Crescimento, *ou seja,* peso do peixe em função do tempo ou logaritmo natural do peso em função do tempo (incluindo a constante de velocidade de crescimento obtida, k_g);

  — Fixação e depuração da substância em estudo nos peixes (na forma de gráfico);

  — Surgimento do estado estacionário (se pertinente);

  — Logaritmo natural da concentração em função do tempo de fixação (incluindo a constante de velocidade de fixação obtida k_1);

  — Logaritmo natural da concentração em função do tempo de depuração (incluindo a constante de velocidade de depuração obtida k_2); e

  — Curvas das fases de fixação e depuração que demonstram os dados e o modelo ajustado.

— Se uma inspeção visual de uma representação gráfica revelar valores anómalos evidentes, é possível aplicar um teste estatisticamente válido a estes valores, para eliminar dados espúrios e apresentar uma justificação documentada para a sua omissão.

— Fator de bioconcentração do estado estacionário (BCF_{SS}), caso quase se atinja o estado estacionário.

— Fator de bioconcentração cinético (BCF_K) e constantes de velocidade de fixação e de depuração obtidas, k_1 e k_2, em conjunto com as variâncias de k_2 (declive e ordenada na origem) caso se utilize ajustamento sequencial.

— Intervalos de confiança, desvio-padrão (conforme disponível) e métodos de cálculo/análise de dados para cada parâmetro para cada concentração da substância em estudo utilizada.

  — Quaisquer informações relativas aos metabolitos da substância em estudo com marcação radioativa e à respetiva acumulação.

  — A(s) constante(s) de velocidade de crescimento (incluindo intervalo(s) de confiança de 95 %) e a constante de velocidade de depuração calculada, corrigida em função do crescimento (k_{2g}), a semivida e o BCF (BCF_{Kg}).

  — Devem referir-se quaisquer ocorrências especiais registadas no decurso do ensaio, bem como quaisquer desvios relativamente ao procedimento ou outras informações de relevo.

  — Um quadro recapitulativo dos dados calculados e medidos pertinentes, como:

▼M7

Constantes de velocidade de fixação e de depuração da substância e fatores de bioconcentração (BCF)	
k_g (constante de velocidade de crescimento; dia^{-1}):	Inserir valor (IC 95 %) (1)
k_1 (constante de velocidade de fixação global; $l\ kg^{-1}\ dia^{-1}$):	Inserir valor (IC 95 %) (1)
k_2 (constante de velocidade de depuração global; dia^{-1}):	Inserir valor (IC 95 %) (1)
k_{2g} (constante de velocidade de depuração corrigida em função do crescimento; dia^{-1}):	Inserir valor (IC 95 %) (1)
C_f (concentração do produto químico nos peixes em estado estacionário; mg kg^{-1}):	Inserir valor ± SD (2)
C_w (concentração do produto químico na água; mg l^{-1}):	Inserir valor ± SD (2)
L_n (fator de normalização dos lípidos):	Inserir valor (3)
BCF_{SS} (BCF do estado estacionário; $l\ kg^{-1}$)	Inserir valor ± SD (2)
BCF_{SSL} (BCF do estado estacionário normalizado em função dos lípidos; $l\ kg^{-1}$):	Inserir valor (3) ± SD (2)
BCF_K (BCF cinético; $l\ kg^{-1}$)	Inserir valor (IC 95 %) (1)
BCF_{Kg} (BCF cinético corrigido em função do crescimento; $l\ kg^{-1}$)	Inserir valor (IC 95 %) (1)
$t_{1/2g}$ (semivida corrigida em função do crescimento; dia):	Inserir valor (IC 95 %) (1)
BCF_{KL} (BCF cinético normalizado em função dos lípidos; $l\ kg^{-1}$):	Inserir valor
BCF_{KLG} (BCF cinético corrigido em função do crescimento e normalizado em função dos lípidos; $l\ kg^{-1}$):	Inserir valor

(1) IC: intervalo de confiança (sempre que a estimativa seja possível)
(2) SD: Desvio-padrão (sempre que a estimativa seja possível)

Deve evitar-se registar resultados como «não detetados/quantificados no limite de deteção/quantificação» mediante o desenvolvimento de um método e de um protocolo experimental preliminares, uma vez que esses resultados não podem ser utilizados para o cálculo das constantes de velocidade.

C.13 — II **ENSAIO MINIMIZADO DE EXPOSIÇÃO AQUOSA EM PEIXES**

INTRODUÇÃO

A experiência crescente adquirida na realização e interpretação do ensaio completo, tanto por laboratórios como por entidades reguladoras, demonstra que — com algumas exceções — é aplicável uma cinética de primeira ordem à estimativa das constantes de velocidade de fixação e de depuração. É, pois, possível estimar as constantes de velocidade de fixação e de depuração com um número mínimo de pontos de amostragem e obter o BCF cinético.

O objetivo inicial do exame de conceções alternativas para estudos do BCF consistiu em desenvolver um ensaio minimizado a utilizar numa fase intermédia, para refutar ou confirmar as estimativas do BCF com base no K_{OW} e na ferramenta QSAR e eliminar, desse modo, a necessidade de um estudo completo para

▼M7

muitas substâncias, bem como em minimizar os custos e a utilização de animais através da recolha de menos amostras e da redução do número de sequências analíticas realizadas. Seguindo a principal conceção do método de ensaio anterior para permitir a integração dos resultados do ensaio com os dados existentes relativos ao BCF, e de modo a facilitar o desempenho do ensaio e a interpretação dos dados, o objetivo consiste em apresentar estimativas do BCF de exatidão e precisão adequadas para a tomada de decisões em matéria de avaliação de riscos. São válidos muitos dos mesmos pressupostos que no ensaio completo, no que respeita, p. ex., aos critérios de validade (*cf.* ponto 24) e à interrupção do ensaio caso se verifique uma fixação insignificante no final da fase de fixação (*cf.* pontos 16 e 38).

As substâncias elegíveis para o ensaio de conceção minimizada devem pertencer ao domínio geral para o qual o método de ensaio foi desenvolvido, *ou seja,* substâncias orgânicas não polares (*cf.* ponto 49). Caso existam indícios de que a substância a ensaiar poderá apresentar um comportamento diferente (por exemplo, um desvio claro de uma cinética de primeira ordem), deve realizar-se um ensaio completo, para fins regulamentares.

Normalmente, a duração do ensaio minimizado não é mais curta do que a do ensaio normal do BCF, mas utiliza-se uma amostra de peixes mais reduzida (ver fundamentação no apêndice 6). Todavia, o período de depuração pode ser reduzido no caso de substâncias com depuração rápida, para evitar a ocorrência de concentrações nos peixes inferiores ao limite de deteção/quantificação antes do final do ensaio. Para determinar a necessidade da realização de um ensaio completo, é possível utilizar um ensaio de exposição de tipo minimizado em peixes com uma única concentração; se os dados resultantes utilizados para calcular as constantes de velocidade e o BCF forem sólidos (*cf.* ponto 93), o ensaio completo é dispensável caso o BCF resultante não se aproxime de valores regulamentares críticos.

Em alguns casos, pode ser vantajoso realizar um ensaio preliminar de conceção minimizada com mais do que uma concentração, para determinar se as estimativas do BCF para a substância dependem da concentração. Se for o caso, será necessário realizar o ensaio completo. Se o ensaio minimizado demonstrar que as estimativas do BCF não dependem da concentração mas os resultados não forem considerados definitivos, é possível executar qualquer ensaio completo subsequente com uma única concentração, reduzindo assim a utilização de animais em comparação com um teste completo com duas (ou mais) concentrações.

As substâncias potencialmente elegíveis para o ensaio minimizado devem:

— Ser suscetíveis de apresentar, aproximadamente, uma cinética de fixação e de depuração de primeira ordem, por exemplo, decorrente de um método comparativo com substâncias semelhantes;

— Apresentar log K_{OW} < 6, a menos que se preveja um metabolismo rápido ([1]);

— Ser suficientemente solúveis em água, atendendo à técnica analítica (*cf.* ponto 24);

— Ser claramente quantificáveis (*isto é,* as concentrações devem ser, pelo menos, de uma ordem de grandeza superior ao limite de quantificação), tanto nos peixes como na água; recomenda-se o recurso à marcação radioativa (*cf.* ponto 23); e

— Ter um período de depuração superior à respetiva semivida prevista (*cf.* apêndice 5 para cálculos), sem o que a duração da depuração deve ser ajustada em conformidade (*cf.* ponto 91). Permite-se uma exceção a esta regra caso se preveja que a substância tenha um metabolismo rápido.

([1]) Com efeito, o ensaio minimizado pode ser utilizado para demonstrar um metabolismo rápido sempre que se saiba que o mesmo é provável.

▼M7

CALENDÁRIO DE AMOSTRAGEM PARA ESTUDOS QUE SEGUEM A CONCEÇÃO MINIMIZADA

Recolha de amostras de peixes

A recolha de amostras de peixes é reduzida a quatro pontos de amostragem:

— A meio e no final da fase de fixação (sendo a última igualmente o início da fase de depuração), por exemplo, após 14 e 28 dias (33).

— A meio da fase de depuração e no final do estudo (no qual a concentração da substância é < 10 % da concentração máxima ou, pelo menos, a um tempo claramente superior à semivida da substância), p. ex., após 7 e 14 dias de depuração (33). Caso se preveja ou observe uma depuração rápida, pode ser necessário reduzir o período de depuração para evitar concentrações inferiores ao limite de quantificação nos peixes.

— Medição de lípidos: idêntica ao estudo completo.

— Correção em função do crescimento, tal como no estudo completo.

— BCF: calculado como BCF cinético.

Recolha de amostras de água

Na conceção minimizada, as amostras de água são recolhidas como no estudo completo (*cf.* ponto 54) ou, pelo menos, cinco vezes, igualmente divididas durante a fase de fixação e semanalmente na fase de depuração.

Alterações à conceção

Atendendo às propriedades da substância em estudo, às previsões QSAR válidas e ao objetivo específico do estudo, é possível ponderar algumas alterações à conceção do mesmo:

— Caso seja necessária uma precisão mais elevada, é possível utilizar mais peixes (6 ou 8 em vez de 4) para a amostra no final da fase de fixação.

— Deve incluir-se um grupo «adicional» de peixes se, aos 14 dias — ou no final previsto da fase de depuração — esta última não tiver atingido um nível adequado (*ou seja,* > 50 %). Caso a duração prevista da fase de depuração for inferior ou superior a 14 dias, o calendário de amostragem deve ser adaptado (*ou seja,* um grupo de peixes no final previsto da fase de depuração e um grupo após metade desse período).

— Devem utilizar-se duas concentrações de ensaio para explorar uma possível dependência da concentração. Caso os resultados do ensaio minimizado, realizado com duas concentrações de ensaio, demonstrem que o BCF não depende da concentração (*ou seja,* difere menos de 20 %), uma concentração de ensaio pode ser considerada suficiente num ensaio completo, se for realizado.

— É provável que seja possível utilizar modelos de processos de bioacumulação como os propostos por Arnot *et al.* (35) para assistir no planeamento da duração das fases de fixação e de depuração (ver também o apêndice 5).

Cálculos

A fundamentação subjacente a esta metodologia é que o fator de bioconcentração num ensaio completo pode ser determinado como fator de bioconcentração do estado estacionário (BCF_{SS}), através do cálculo do rácio entre a concentração da substância em estudo nos tecidos dos peixes e a concentração da substância em estudo na água, ou mediante o cálculo do fator de bioconcentração cinético (BCF_K) como rácio entre a constante de velocidade de fixação k_1 e a constante de velocidade de depuração k_2. O BCF_K é válido mesmo que não se alcance a concentração da substância no estado estacionário durante a fixação, desde que esta última e a depuração sigam aproximadamente processos de cinética de

▼M7

primeira ordem. Como mínimo absoluto, são necessários dois valores para estimar as constantes de velocidade de fixação e de depuração, um no final da fase de fixação (*ou seja,* no início da fase de depuração) e um no final (ou após uma parte significativa) da fase de depuração. Recomenda-se um ponto de amostragem intermédio como verificação da cinética de fixação e de depuração ([1]). Para cálculos, ver apêndices 5 e 6.

Interpretação dos resultados

Para avaliar a validade e o valor informativo do ensaio, deve verificar-se que o período de depuração excede uma semivida. Além disso, deve comparar-se o BCF_{Km} (BCF cinético decorrente de um ensaio minimizado) com o valor do BCF_{SS} minimizado (que é o BCF_{SS} calculado no final da fase de fixação, pressupondo o surgimento do estado estacionário. O que precede é apenas um pressuposto, já que o número de pontos de amostragem não é suficiente para o provar). Se $BCF_{Km} < BCF_{SS}$ minimizado, este último é o valor preferível. Se BCF_{Km} for inferior a 70 % do BCF_{SS} minimizado, os resultados não são válidos e deve realizar-se um ensaio completo.

Caso o BCF_{Km} obtido no ensaio minimizado seja próximo de um valor regulamentar crítico, deve realizar-se um ensaio completo. Caso contrário (valor muito superior ou inferior aos valores regulamentares críticos), pode não ser necessário realizar um ensaio completo; se exigido pelo quadro regulamentar aplicável, pode realizar-se um ensaio completo com uma única concentração.

Caso se considere, após um ensaio minimizado com uma concentração, que é necessário um ensaio completo, este pode ser executado com uma segunda concentração. Se os resultados forem coerentes, é possível dispensar um ensaio completo adicional com uma concentração diferente, já que não se prevê que a bioconcentração da substância dependa da concentração. Se o ensaio minimizado tiver sido realizado com duas concentrações e os resultados não demonstrarem qualquer dependência da concentração, é possível executar o ensaio total com uma única concentração (*cf.* ponto 87).

Relatório de ensaio

O relatório do ensaio minimizado deve incluir todas as informações exigidas para o ensaio completo (*cf.* ponto 81), exceto aquelas cuja obtenção não é possível (*ou seja,* uma curva que demonstre o surgimento do estado estacionário e o fator de bioconcentração do estado estacionário; neste último caso, deve apresentar-se, em vez disso, o BCF_{ss} minimizado). Deve também incluir os fundamentos para a utilização do ensaio minimizado e o BCF_{Km} resultante.

C.13 — III **ENSAIO DE BIOACUMULAÇÃO COM EXPOSIÇÃO POR VIA ALIMENTAR EM PEIXES**

INTRODUÇÃO

Deve utilizar-se o método descrito na presente secção para substâncias relativamente às quais a metodologia da exposição aquosa não é viável (por exemplo, por não ser possível manter concentrações estáveis e determináveis na água nem atingir cargas corporais adequadas em 60 dias de exposição; ver secções anteriores sobre o método de exposição aquosa). Contudo, é necessário estar consciente de que o parâmetro do presente ensaio é um fator de bioamplificação por via alimentar (BMF) em vez de um fator de bioconcentração (BCF) ([2]).

Na conferência SETAC-Europe realizada em Madrid em maio de 2001, foi apresentado um novo método para a realização de ensaios de bioacumulação de substâncias orgânicas pouco solúveis em água (36). Este trabalho baseou-se em vários estudos de bioacumulação relatados na literatura que utilizam um

([1]) Quando são medidos apenas dois valores, é possível obter estimativas dos intervalos de confiança para o BCF_{Km} mediante uma técnica de estimativa da variância. Quando também se encontram disponíveis valores intermédios, é possível calcular intervalos de confiança para o BCF_{Km} como no teste completo.

([2]) Ver apêndice 1 para definições e unidades

▼M7

método de dosagem com alimentação enriquecida — vide, *por exemplo*, (37). No início de 2004, foi apresentado a um grupo de trabalho da UE sobre substâncias PBT um projeto de protocolo (38) destinado a determinar o potencial de bioacumulação de substâncias orgânicas pouco solúveis em água às quais o método normal de bioconcentração com exposição aquosa não era aplicável, juntamente com um documento de base de apoio (39). Uma das justificações adicionais apresentadas para o método foi que a exposição potencial por via do ambiente a estas substâncias pouco solúveis (log K_{OW} >5) pode ocorrer, em larga escala, através da alimentação (*cf.* (40) (41) (42) (43) (44)). Por este motivo, os ensaios de exposição por via alimentar são mencionados em alguns regulamentos relativos aos produtos químicos ([1]). Todavia, note-se que o método descrito evita cuidadosamente a exposição através da fase aquosa, pelo que não é possível comparar diretamente um BMF decorrente do presente método de ensaio com um BMF obtido por meio de um estudo de campo (no qual é possível combinar as exposições aquosa e por via alimentar).

A presente secção do método de ensaio baseia-se nesse protocolo (38) e constitui um novo método que não constava da anterior versão do método C.13. Este ensaio alternativo permite que a via de exposição alimentar seja diretamente analisada em condições laboratoriais controladas.

Os investigadores interessados devem consultar os pontos 1 a 14 do presente método de ensaio para informações sobre as circunstâncias em que o ensaio de exposição por via alimentar pode ser preferível ao ensaio de exposição por via aquosa. Apresentam-se informações sobre vários aspetos relativos às substâncias, que devem ser tidos em conta antes da realização de um ensaio.

Pode ponderar-se a utilização de substâncias com marcação radioativa com uma fundamentação semelhante às do método de exposição aquosa (*cf.* pontos 6 e 65).

É possível utilizar o método por via alimentar para ensaiar mais do que uma substância num único ensaio, desde que se cumpram determinados critérios, referidos de forma mais pormenorizada no ponto 112. Neste caso, por motivos de simplicidade, o método descreve um ensaio com apenas uma substância em estudo.

O ensaio por via alimentar é semelhante ao método de exposição aquosa em muitos aspetos, com a exceção evidente da via de exposição. Assim, muitos aspetos do método aqui descrito sobrepõem-se ao método de exposição por via aquosa descrito na secção anterior. Na medida do possível, apresentam-se referências cruzadas para os números pertinentes na secção anterior, mas, no interesse da facilidade de leitura e da compreensão, são inevitáveis algumas duplicações.

PRINCÍPIO DO ENSAIO

Podem utilizar-se condições dinâmicas ou semiestáticas (*cf.* ponto 4); recomendam-se as condições dinâmicas para limitar a potencial exposição da substância em estudo através da água em resultado de qualquer dessorção dos alimentos enriquecidos ou das fezes. O ensaio compreende duas fases: fixação (substância em estudo-alimentação enriquecida) e depuração (alimentação limpa, sem tratamento) — *cf.* ponto 16. Na fase de fixação, um grupo de peixes de ensaio é alimentado, diariamente, com uma dieta constituída por alimento comercial para peixes, de composição conhecida, enriquecido com a substância em estudo. Idealmente, os peixes devem consumir todo o alimento oferecido (*cf.* ponto 141). De seguida, são alimentados com alimento comercial para peixes não tratado durante a fase de depuração. No que respeita ao método de exposição por via aquosa, é possível utilizar, se necessário, mais do que um grupo de ensaio com diferentes concentrações da substância em estudo; porém, para a maioria das

([1]) Para efeitos do Regulamento (CE) n.º 1907/2006 relativo ao registo, avaliação, autorização e restrição de produtos químicos (REACH) (JO L 396 de 30.12.2006, p. 1), esta questão é abordada no documento *Guidance on Information Requirements and Chemical Safety Assessment*, capítulo R.7c, R.7.10.3.1; R.7.10.4.1; figura R7.10-2.

▼M7

substâncias orgânicas muito hidrófobas, um grupo de ensaio é suficiente (*cf.* pontos 49 e 107). Caso se utilizem condições semiestáticas, os peixes devem ser transferidos para um novo meio e/ou uma nova célula de ensaio no final da fase de fixação, se o meio e/ou o equipamento utilizados na fase de fixação tiverem sido contaminados com a substância em estudo por lixiviação. As concentrações da substância em estudo nos peixes são determinadas em ambas as fases do ensaio. Para além do grupo de peixes alimentado com a dieta enriquecida (grupo de ensaio), mantém-se um grupo de peixes de controlo em condições idênticas, sendo os animais alimentados de modo idêntico, com a exceção de o alimento comercial para peixes não ser enriquecido com a substância em estudo. Este grupo de controlo permite a quantificação dos níveis de fundo da substância em estudo nos peixes não expostos e serve de comparação para quaisquer efeitos adversos, relacionados com o tratamento, observados no(s) grupo(s) de ensaio ([1]). Além disso, permite a comparação das constantes de velocidade de crescimento entre grupos, para verificar que foram consumidas quantidades semelhantes da dieta oferecida (na explicação das diferenças entre as constantes de velocidade de crescimento, devem também ser tidas em conta eventuais diferenças na palatabilidade das dietas; *cf.* ponto 138). É importante que, tanto na fase de fixação como na de depuração, sejam fornecidas aos grupos de ensaio e de controlo dietas equivalentes em termos nutricionais.

De acordo com a experiência dos criadores do método, uma fase de fixação compreendida entre 7 e 14 dias é, em geral, suficiente (38) (39). Este intervalo deve minimizar o custo da realização do ensaio, continuando a garantir uma exposição suficiente à maioria das substâncias. Contudo, em alguns casos, a fase de fixação pode ser prolongada (*cf.* ponto 127). Durante a fase de fixação, a concentração da substância nos peixes pode não atingir o estado estacionário, pelo que os resultados e o tratamento dos dados decorrentes deste método se baseiam, em regra, numa análise cinética dos resíduos presentes nos tecidos. (Nota: Neste caso, bem como no ensaio de exposição aquosa, é possível aplicar as equações para a estimativa do surgimento do estado estacionário — ver apêndice 5). A fase de depuração tem início quando os peixes são pela primeira vez alimentados com uma dieta não enriquecida e, em geral, a sua duração é de, no máximo, 28 dias, ou até que deixe de ser possível quantificar a substância em estudo no peixe inteiro, consoante o que ocorrer primeiro. A fase de depuração pode ser reduzida ou prolongada para além de 28 dias, consoante a evolução das concentrações químicas determinadas e da dimensão dos peixes com o tempo.

Este método permite a determinação da semivida específica da substância ($t_{1/2}$, a partir da constante de velocidade de depuração, k_2), da eficiência de assimilação (absorção intestinal; *a*), do fator de bioamplificação cinético por via alimentar (BMF_K), do fator de bioamplificação cinético por via alimentar, corrigido em função do crescimento (BMF_{Kg}), e do fator de bioamplificação cinético por via alimentar, corrigido em função dos lípidos ([2]) (BMF_{KL}) (e/ou do fator de bioamplificação cinético por via alimentar corrigido em função do crescimento e dos lípidos, BMF_{KgL}), para a substância em estudo, nos peixes. No que diz respeito ao método de exposição aquosa, o aumento da massa dos peixes durante o ensaio resultará na diluição da substância em estudo no peixe em crescimento e, como tal, o BMF (cinético) será subestimado se não for corrigido em função do crescimento (*cf.* pontos 162 e 163). Além disso, caso se considere que se atingiu o estado estacionário na fase de fixação, é possível calcular um BMF indicativo do estado estacionário. Encontram-se disponíveis metodologias que tornam possível estimar um fator de bioconcentração cinético (BCF_K) a partir de dados gerados no estudo relativo à via alimentar (por exemplo, (44) (45) (46) (47) (48). As vantagens e desvantagens destas metodologias são debatidas no apêndice 8.

([1]) No que se refere à maior parte das substâncias em estudo, não se deve, idealmente, efetuar determinações na água de controlo. As concentrações de fundo só devem ser relevantes no caso dos materiais presentes na natureza (por exemplo, alguns metais) e as substâncias muito disseminadas no ambiente.

([2]) Uma vez que o BMF é definido como o rácio entre a concentração de uma substância num organismo e a que se encontra presente nos alimentos do organismo no estado estacionário, os lípidos são tidos em conta através da correção do teor de lípidos no organismo e nos alimentos, pelo que é mais corretamente descrito como uma «correção» Esta metodologia difere da «normalização» para um teor de lípidos definido no organismo, como se verifica no ensaio de bioconcentração de exposição aquosa.

▼M7

O ensaio foi concebido sobretudo para substâncias orgânicas não polares pouco solúveis que, nos peixes, seguem aproximadamente uma cinética de fixação e de depuração de primeira ordem. Caso uma substância ensaiada não siga aproximadamente uma cinética de fixação e de depuração de primeira ordem, há que recorrer a modelos mais complexos (ver referências no apêndice 5) e procurar aconselhamento de um perito em bioestatística ou farmacocinética.

Em regra, o BMF é determinado através da análise da substância em estudo no peixe inteiro, em relação à massa húmida. Se pertinente para os objetivos do estudo, é possível recolher tecidos específicos (por exemplo, músculo, fígado) para amostra, se o peixe se dividir em partes comestíveis e não comestíveis (*cf.* ponto 21). Além disso, pode proceder-se à remoção e análise separada do aparelho digestivo para determinar o contributo para as concentrações do peixe inteiro no que se refere aos pontos de amostragem no final da fase de fixação e perto do início da fase de depuração, ou no contexto de uma metodologia de balanço de massas.

Deve determinar-se o teor de lípidos dos peixes inteiros recolhidos para amostra, corrigindo as concentrações em função dos lípidos, tendo em conta o teor de lípidos tanto da dieta como dos peixes (*cf.* pontos 56 e 57 e apêndice 7).

Os peixes recolhidos para amostra devem ser pesados, devendo o seu peso ser registado e relacionado com a concentração de produto químico determinada em cada peixe (p.. ex., através de um código de identificação único para cada peixe recolhido para amostra), para efeitos de cálculo do crescimento que pode ocorrer durante o ensaio. Sempre que possível, deve-se igualmente medir o comprimento total dos peixes ([1]). Os dados relativos ao peso são também necessários para estimar o BCF através dos dados de depuração do ensaio por via alimentar.

INFORMAÇÕES RELATIVAS À SUBSTÂNCIA EM ESTUDO

Deve dispor-se de informações sobre a substância em estudo, tal como descrito nos pontos 3 e 22. Em regra, não é necessário utilizar um método analítico para determinar as concentrações da substância em estudo na água; são, contudo, necessários métodos com sensibilidade adequada para determinar as concentrações nos alimentos dos peixes e nos tecidos destes.

É possível ensaiar mais do que uma substância num único ensaio. Todavia, as substâncias em estudo devem ser compatíveis entre si, para que não interajam nem alterem a sua identidade química quando forem introduzidas na alimentação dos peixes. O objetivo consiste em que os resultados determinados para cada substância ensaiada em conjunto não sejam muito diferentes dos resultados que se obteriam em caso de realização de ensaios individuais a cada substância. Devem realizar-se análises preliminares para determinar a possibilidade de recuperar cada substância a partir de alimentos enriquecidos com várias substâncias, bem como de amostras de tecidos dos peixes com i) recuperações elevadas (por exemplo, > 85 % do valor nominal) e ii) a sensibilidade necessária para o ensaio. A dose total de substâncias ensaiadas em conjunto deve ser inferior à concentração combinada passível de provocar efeitos tóxicos (*cf.* ponto 51). Além disso, a conceção experimental deve ter em conta possíveis efeitos adversos nos peixes, bem como o potencial de efeitos interativos (por exemplo, efeitos metabólicos) associados ao ensaio simultâneo de várias substâncias. Deve evitar-se o ensaio simultâneo de substâncias ionizáveis. Em termos de exposição, o método também é adequado para misturas complexas (*cf.* ponto 13, embora se registem as mesmas limitações na análise do que em qualquer outro método).

VALIDADE DO ENSAIO

O ensaio será considerado válido se se verificarem as seguintes condições (*cf.* ponto 24):

— A variação da temperatura da água deve ser inferior a ± 2 °C nos grupos de tratamento ou de controlo;

([1]) Deve registar-se igualmente o comprimento total durante o ensaio, uma vez que é um bom indicador da ocorrência de um efeito adverso.

▼M7

— A concentração de oxigénio dissolvido não deve ser inferior a 60 % do valor da concentração de saturação com ar;

— A concentração da substância em estudo na alimentação dos peixes antes da fase de fixação e no final da mesma não deve exceder o intervalo de ± 20 % (com base em pelo menos três amostras em ambos os momentos);

— Deve demonstrar-se um elevado grau de homogeneidade da substância no alimento nas análises preliminares efetuadas à dieta enriquecida; pelo menos três amostras da concentração da substância recolhidas no início do ensaio não devem variar mais do que ± 15 % relativamente à média;

— Nos alimentos não enriquecidos ou nos tecidos dos peixes do lote de controlo, não se devem detetar concentrações da substância em estudo, ou estas devem encontrar-se presentes apenas em níveis vestigiais normais, em relação às amostras tratadas;

— A mortalidade ou quaisquer outros efeitos nocivos registados no final do ensaio, tanto no que respeita ao grupo de controlo como ao grupo de ensaio, deve ser ≤ 10 %; se o ensaio for prolongado por algum motivo, os efeitos adversos em ambos os grupos devem ser ≤ 5 % por mês e ≤ 30 % cumulativamente. Diferenças significativas no crescimento médio entre os lotes de controlo e de ensaio dos peixes recolhidos para amostra podem indicar um efeito tóxico da substância em estudo.

SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

Caso um laboratório nunca tenha realizado o ensaio ou se tenham registado alterações significativas (por exemplo, alteração do fornecedor ou da estirpe dos peixes, espécie diferente, alteração significativa da dimensão dos peixes ou do método de enriquecimento, etc.), recomenda-se a realização de um estudo de competência técnica com uma substância de referência. Esta é utilizada, sobretudo, para determinar se a técnica de enriquecimento dos alimentos é adequada para garantir a homogeneidade e biodisponibilidade máximas das substâncias em estudo. O hexaclorobenzeno (HCB) constitui um exemplo de substância hidrófoba não polar já utilizada, mas, atendendo às suas propriedades perigosas, deve ponderar-se o recurso a outras substâncias para as quais existam dados de fixação e bioamplificação fiáveis ([1]). Se for utilizada uma substância de referência, o relatório de ensaio deve conter informações básicas sobre a mesma, nomeadamente o nome, o grau de pureza, o número CAS, a estrutura, dados de toxicidade (caso se disponha deles), bem como sobre as substâncias em estudo (*cf.* pontos 3 e 22).

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Equipamento

Os materiais e equipamentos devem ser utilizados do modo descrito no método de exposição aquosa (*cf.* ponto 26). Deve utilizar-se um sistema de ensaio de renovação dinâmica ou estática que proporcione um volume suficiente de água de diluição aos tanques de ensaio. Os caudais devem ser registados.

Água

A água de ensaio deve ser utilizada do modo descrito no método de exposição aquosa (*cf.* pontos 27-29). O meio de ensaio deve ser caracterizado como descrito e a respetiva qualidade deve permanecer constante durante o ensaio. No início do ensaio, o teor de partículas naturais e o carbono orgânico total devem ser tão baixos quanto possível (≤ 5 mg/l partículas; ≤ 2 mg/l carbono orgânico total). Só é necessário determinar o COT antes do ensaio no contexto da caracterização da água (*cf.* ponto 53).

([1]) O HCB consta dos anexos A e C da Convenção de Estocolmo e dos anexos I e III do Regulamento (CE) n.º 850/2004 relativo a poluentes orgânicos persistentes (JO L 158 de 30.4.2004, p. 7)

▼M7

Regime alimentar

Recomenda-se alimento para peixes disponível no mercado (dieta granulada flutuante e/ou que afunde lentamente), caracterizado, pelo menos, pelo teor de proteínas e gordura. Os alimentos devem ser constituídos por granulados de tamanho uniforme para aumentar a eficiência da exposição aos mesmos, *ou seja,* os peixes comerão mais alimentos em vez de ingerirem os pedaços maiores e não os pequenos. Os granulados devem ter uma dimensão adequada ao tamanho dos peixes no início do ensaio (o diâmetro de cada grânulo pode ser sensivelmente 0,6-0,85 mm, para peixes com um comprimento total entre 3 e 7 cm, e 0,85-1,2 mm, para peixes com um comprimento total entre 6 e 12 cm). É possível ajustar a dimensão dos granulados em função do crescimento dos peixes no início da fase de depuração. O anexo 7 apresenta um exemplo de uma composição alimentar adequada disponível no mercado. Nos ensaios para o desenvolvimento do método, foram geralmente utilizados regimes alimentares com um teor de lípidos total entre 15 e 20 % (p/p). Em algumas regiões, podem não se encontrar disponíveis alimentos para peixes com uma concentração de lípidos tão elevada. Nesse caso, os estudos podem utilizar alimentos com uma concentração de lípidos inferior, podendo, se necessário, ajustar-se a taxa de alimentação em conformidade para manter a saúde dos peixes, com base em ensaios preliminares. O teor de lípidos total das dietas do grupo de ensaio e do grupo de controlo deve ser determinado e registado antes do início do ensaio e no final da fase de fixação. O relatório deve conter as informações facultadas pelo fornecedor do alimento comercial no respeitante ao teor de nutrientes, humidade, fibra e cinzas, e, se possível, minerais e resíduos de pesticidas (p. ex., poluentes prioritários «normais»).

Aquando do enriquecimento dos alimentos com a substância em estudo, devem envidar-se todos os esforços para garantir a homogeneidade em toda alimentação de ensaio. A concentração da substância em estudo nos alimentos do grupo de ensaio deve ser selecionada tendo em conta a sensibilidade da técnica analítica, a toxicidade da substância em estudo (NOEC, se conhecida) e os dados físico-químicos relevantes. Se utilizada, a substância de referência deve, preferentemente, ser incorporada numa concentração próxima de 10 % da concentração da substância em estudo — ou, em qualquer caso, o mínimo possível —, sob reserva de uma análise de sensibilidade (p. ex., para o hexaclorobenzeno, considera-se aceitável uma concentração de 1-100 μg/g nos alimentos; ver a referência 47 para informações adicionais sobre as eficiências de assimilação do HCB).

Os alimentos dos peixes podem ser enriquecidos com a substância em estudo de várias formas, consoante as características físicas e a solubilidade da mesma (ver apêndice 7 para informações adicionais sobre os métodos de enriquecimento):

— Se a substância for solúvel e estável em triglicéridos, deve ser dissolvida numa pequena quantidade de óleo de peixe ou óleo vegetal comestível antes de ser misturada com o alimento dos peixes. Neste caso, há que evitar produzir uma ração com um teor de lípidos demasiado elevado, tendo em conta o teor de lípidos natural da alimentação enriquecida, adicionando a quantidade mínima conhecida de óleo necessária para atingir a distribuição e homogeneidade da substância em estudo nos alimentos, ou;

— A alimentação deve ser enriquecida recorrendo a um solvente orgânico adequado, desde que isso não comprometa a homogeneidade e a biodisponibilidade (pode ocorrer a formação de (micro)cristais da substância em estudo nos alimentos em consequência da evaporação do solvente e não existe uma forma fácil de provar que tal não se verificou; cf. (49)), ou;

— Os líquidos não viscosos devem ser adicionados diretamente aos alimentos dos peixes, mas devem ser bem misturados para promover a homogeneidade e facilitar uma boa assimilação. A técnica de mistura deve garantir a homogeneidade do alimento enriquecido.

▼M7

Num número reduzido de casos — p. ex., substâncias em estudo menos hidrófobas e mais suscetíveis de dessorção dos alimentos —, pode ser necessário revestir os granulados alimentares preparados com uma pequena quantidade de óleo de peixe/milho (ver ponto 142). Nestes casos, os alimentos de controlo devem ser tratados de forma semelhante e deve utilizar-se a alimentação final preparada para determinar o teor de lípidos.

Se for utilizada uma substância de referência, os resultados relativos a esta devem ser comparáveis aos dados de estudos disponíveis na literatura levados a cabo em condições semelhantes com uma taxa de alimentação comparável (*cf.* ponto 45) e os parâmetros específicos da substância de referência devem cumprir os critérios relevantes constantes do ponto 113 (3.º, 4.º e 5.º travessões).

Caso se utilize um óleo ou um solvente como excipiente para a substância em estudo, deve misturar-se uma quantidade equivalente do mesmo (excluindo a substância em estudo) com o regime alimentar de controlo, de modo a manter a equivalência com a alimentação enriquecida. É importante que, tanto na fase de fixação como na de depuração, sejam fornecidas aos grupos de ensaio e de controlo dietas equivalentes em termos nutricionais.

A alimentação enriquecida deve ser armazenada em condições que mantenham a estabilidade da substância em estudo na alimentação (p. ex., refrigeração), devendo registar-se essas condições.

Seleção das espécies de peixes

Podem utilizar-se as espécies de peixes especificadas para a exposição aquosa (*cf.* ponto 32 e apêndice 3). A truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), a carpa (*Cyprinus carpio*) e o vairão-de-cabeça-grande (*Pimephales promelas*) foram habitualmente utilizados em estudos de bioacumulação por via alimentar com substâncias orgânicas antes da publicação do presente método. As espécies de ensaio devem ter um comportamento alimentar que resulte no consumo rápido da ração alimentar administrada, para minimizar qualquer fator que influencie a concentração da substância em estudo nos alimentos (p. ex., lixiviação para a água e a possibilidade de exposição aquosa). Devem utilizar-se peixes na gama de tamanho/peso recomendada (*cf.* apêndice 3). Os peixes não devem ser de uma dimensão demasiado reduzida para não dificultarem as análises numa base individual. As espécies ensaiadas numa fase da vida com crescimento rápido podem complicar a interpretação dos dados; as taxas de crescimento elevadas podem influenciar o cálculo da eficiência de assimilação ([1]).

Confinamento dos peixes

Os critérios de aceitação relativos à aclimatação, à mortalidade e à doença são idênticos aos aplicáveis ao método de exposição aquosa antes da realização do ensaio (*cf.* pontos 33-35).

REALIZAÇÃO DO ENSAIO

Trabalhos anteriores ao estudo e ensaio de determinação da gama de concentrações

O trabalho analítico prévio ao estudo é necessário para demonstrar a recuperação da substância dos tecidos dos peixes/alimentos enriquecidos. Nem sempre é necessário efetuar um ensaio de determinação da gama de concentrações para selecionar uma concentração adequada nos alimentos. Para efeitos de demonstração da não ocorrência de efeitos adversos e de avaliação da palatabilidade da alimentação enriquecida, da sensibilidade do método analítico aplicado aos tecidos dos peixes e aos alimentos e da seleção da taxa de alimentação adequada e dos intervalos de amostragem durante a fase de depuração, etc., podem realizar-se experiências preliminares facultativas com a alimentação. Um estudo preliminar pode ser útil para

([1]) Em caso de rápido crescimento durante a fase de fixação, a taxa de alimentação real diminuirá para valores inferiores aos determinados no início da exposição.

▼M7

estimar o número de peixes necessário para efeitos de amostragem durante a fase de depuração. Esse estudo pode resultar na redução significativa do número de peixes utilizado, especialmente no que se refere a substâncias em estudo especialmente suscetíveis ao metabolismo.

Condições de exposição

Duração da fase de fixação

Em regra, é suficiente uma fase de fixação de 7 a 14 dias, durante a qual um grupo de peixes é alimentado com a dieta de controlo e outro grupo alimentado, diariamente, com uma ração fixa da dieta de ensaio, que varia em função da espécie ensaiada e das condições experimentais, por exemplo, entre 1 e 2 % do peso corporal (massa húmida) no caso da truta-arco-íris. A taxa de alimentação deve ser selecionada de modo a evitar o crescimento rápido e um grande aumento do teor de lípidos. Se necessário, a fase de fixação pode ser prolongada com base na experiência prática de estudos anteriores ou no conhecimento da fixação/depuração da substância em estudo (ou de uma substância análoga) nos peixes. O início do ensaio é definido como o momento da primeira administração de alimentos enriquecidos. Um dia experimental tem início com a alimentação e termina pouco antes (p. ex., uma hora) da alimentação seguinte. Por conseguinte, o primeiro dia experimental de fixação tem início com a primeira administração de alimentos enriquecidos e termina pouco antes da segunda administração dos mesmos. Na prática, a fase de fixação termina pouco antes (por exemplo, uma hora) da primeira alimentação sem a adição da substância em estudo, uma vez que os peixes continuarão a digerir alimentos enriquecidos e a absorver a substância em estudo nas 24 horas seguintes. No que se refere ao método analítico, é importante garantir que se atinge uma carga corporal (não tóxica) suficientemente elevada da substância em estudo, de modo a que seja possível, pelo menos, determinar uma redução da ordem de grandeza durante a fase de depuração. Em casos especiais, pode utilizar-se uma fase de fixação prolongada (até 28 dias) com recolha de amostras adicionais de modo a obter informações sobre a cinética de fixação. Durante a fixação, a concentração nos peixes pode não atingir o estado estacionário. Neste caso, como no ensaio de exposição por via aquosa, podem ser aplicadas equações para estimar o surgimento do estado estacionário, indicador da provável duração necessária para atingir concentrações significativas nos peixes (*cf.* apêndice 5).

Em alguns casos, pode saber-se que a fixação da substância nos peixes durante 7--14 dias será insuficiente para que a concentração utilizada nos alimentos seja suficientemente elevada para permitir analisar nos peixes, pelo menos, uma redução da ordem de grandeza durante a depuração — quer devido a uma fraca sensibilidade analítica quer a uma eficiência de assimilação reduzida. Nesses casos, pode ser vantajoso prolongar a fase de alimentação inicial para além dos 14 dias; se se tratar, nomeadamente, de substâncias muito metabolizáveis, deve ponderar-se o recurso a uma concentração alimentar mais elevada. Todavia, durante a fixação, há que manter a carga corporal inferior à concentração prevista sem efeitos crónicos observáveis (NOEC) nos tecidos dos peixes (*cf.* ponto 138).

Duração da fase de depuração

Em regra, a depuração dura, no máximo, 28 dias, tendo início quando os peixes do grupo de ensaio são alimentados com uma dieta pura e não tratada, após a fase de fixação. A depuração tem início com a primeira alimentação «não enriquecida» e não imediatamente após a última alimentação «enriquecida» uma vez que os peixes continuarão a digerir os alimentos e a absorver a substância em estudo nas 24 horas seguintes, tal como referido no ponto 126. Portanto, a primeira amostra da fase de depuração é recolhida pouco antes da segunda alimentação com a dieta não enriquecida. Este período de depuração destina-se a captar substâncias com uma potencial semivida máxima de 14 dias, coerente com a das substâncias biocumulativas ([1]), pelo que um período de 28 dias engloba duas

([1]) Num estudo de exposição aquosa, uma semivida de 14 dias corresponderia a um BCF de cerca de 10 000 l/kg utilizando peixes de 1 g com uma respetiva velocidade de fixação de cerca de 500 L/kg/d (segundo a equação de Sijm *et al* (46)).

▼M7

semividas destas substâncias. No caso de substâncias com bioacumulação muito elevada, pode ser vantajoso prolongar a fase de depuração (se houver indicações nesse sentido com base em ensaios preliminares).

Se uma substância for depurada muito lentamente, impossibilitando a determinação exata da semivida na fase de depuração, as informações podem ser, todavia, suficientes, num contexto de avaliação, para indicar um nível elevado de bioacumulação. Pelo contrário, se uma substância for depurada muito rapidamente, impossibilitando a obtenção de uma concentração fiável no instante zero (concentração no final da fixação/início da depuração, $C_{0,d}$) e de k_2, é possível determinar uma estimativa prudente de k_2 (*cf.* apêndice 7).

Caso as análises dos peixes em intervalos anteriores (por exemplo, 7 ou 14 dias) demonstrem que a substância se depurou até níveis inferiores aos níveis de quantificação antes do final do período de 28 dias, pode não se proceder à recolha subsequente de amostras e concluir-se o ensaio.

Em alguns casos, é possível que não se verifique uma fixação quantificável da substância em estudo no final do período de fixação, nem com a segunda amostra de depuração. Se for possível demonstrar que: i) são cumpridos os critérios de validade constantes do ponto 113; e ii) a ausência de fixação não se deve a outra deficiência do ensaio (por exemplo, duração insuficiente da fase de fixação, deficiência na técnica de enriquecimento da alimentação conducente a uma fraca biodisponibilidade, falta de sensibilidade do método analítico, não-consumo dos alimentos pelos peixes, etc.), pode ser possível concluir o estudo sem a necessidade de o realizar novamente com uma fase de fixação mais longa. Se o trabalho preliminar tiver indicado que tal pode ser o caso, recomenda-se a análise das fezes, se possível, para determinar a ocorrência da substância em estudo não digerida, como parte de uma metodologia de balanço de massas.

Número de peixes

Tal como no ensaio de exposição por via aquosa, devem selecionar-se peixes de peso e comprimento semelhantes, sendo que os peixes mais pequenos não devem apresentar um peso inferior a dois terços do peso do peixe maior (*cf.* pontos 40-42).

O número total de peixes para o ensaio deve ser selecionado com base no calendário de amostragem (um mínimo de uma amostra no final da fase de fixação e quatro a seis amostras durante a fase de depuração, mas dependendo das durações das fases), tomando em conta a sensibilidade da técnica analítica, a concentração suscetível de ser alcançada no final da fase de fixação (com base em conhecimentos prévios) e a duração da depuração (caso seja possível fazer uma estimativa com base em conhecimentos prévios). Devem recolher-se cinco a dez peixes em cada amostragem, medindo-se os parâmetros de crescimento (peso e comprimento total) antes da análise do produto químico ou dos lípidos.

Devido à variabilidade do tamanho, da velocidade de crescimento e da fisiologia entre os peixes, bem como à provável variação da quantidade de dieta administrada que cada peixe consome, devem ser recolhidos para amostra, em cada intervalo, pelo menos cinco peixes do grupo de ensaio e cinco do grupo de controlo, com vista a estabelecer de modo adequado a concentração média e a respetiva variabilidade. Atendendo às metodologias analíticas utilizadas, a variabilidade entre os peixes é suscetível de contribuir mais para a variabilidade não controlada total no ensaio do que a variabilidade inerente, o que, em alguns casos, justifica a utilização de um número máximo de dez peixes por ponto de amostragem. Todavia, se as concentrações de fundo da substância em estudo nos peixes do lote de controlo não forem quantificáveis no início da depuração, pode ser suficiente a análise química de dois a três peixes deste lote apenas no intervalo de amostragem final, desde que os restantes peixes do lote de controlo sejam recolhidos em todos os pontos de amostragem para determinação do peso e do comprimento total (colheita do mesmo número de amostras nos grupos de ensaio e de controlo, para efeitos de determinação do crescimento). Os peixes devem ser armazenados e pesados individualmente — mesmo que se verifique a necessidade de combinar subsequentemente os resultados das amostras —, devendo também medir-se o comprimento total.

▼M7

Um ensaio normal com cinco amostras cuja fase de depuração dure, por exemplo, 28 dias, implica a utilização de um total de 59-120 peixes do grupo de ensaio e 50-110 do grupo de controlo, partindo do princípio de que a técnica analítica da substância permite efetuar a análise do teor de lípidos nos peixes em causa. Se não for possível realizar a análise aos lípidos nos mesmos peixes que foram objeto da análise do produto químico nem utilizar os peixes do lote de controlo apenas para a análise aos lípidos (*cf.* ponto 56), são necessários 15 peixes adicionais (três da população de reserva no início do ensaio, três dos grupos de controlo e de ensaio no início da depuração e três dos grupos de controlo e de ensaio no final da experiência). O apêndice 4 apresenta um exemplo de calendário de amostragem em função do número de peixes.

Carga

Devem utilizar-se rácios água/peixes elevados, semelhantes aos utilizados no método de exposição aquosa (*cf.* pontos 43 e 44). Embora as taxas de carga peixes/água não afetem as concentrações de exposição neste ensaio, recomenda-se uma taxa de carga de 0,1-1,0 g de peixes (massa húmida) por litro de água, por dia, para manter concentrações de oxigénio dissolvido adequadas e minimizar a tensão do organismo de ensaio.

Alimentação e dieta de ensaio

Durante o período de aclimatação, os peixes devem ser alimentados com uma dieta adequada, como descrito supra (ponto 117). Se o ensaio for realizado em condições dinâmicas, estas devem ser suspensas durante a alimentação dos peixes.

Durante o ensaio, a dieta do grupo de ensaio deve ser conforme com a descrita supra (pontos 116-121). Para além da ponderação de fatores específicos da substância, da sensibilidade analítica, da concentração prevista da dieta em condições ambientais e da carga corporal/níveis de toxicidade crónica, a seleção da concentração da substância a incluir na dieta deve ter em conta a palatabilidade do alimento, para que os peixes não evitem a sua ingestão. A concentração nominal da substância em estudo nos alimentos deve ser registada no relatório. Com base na experiência, as concentrações de enriquecimento entre 1-1 000 µg/g proporcionam um intervalo prático de trabalho para as substâncias em estudo que não apresentam um mecanismo tóxico específico. No que se refere às substâncias que atuam através de um mecanismo não específico, os níveis de resíduos nos tecidos não devem exceder 5 µmol/g de lípidos, uma vez que um teor superior a este é suscetível de implicar efeitos crónicos (19) (48) (50) ([1]). Relativamente a outras substâncias, deverá zelar-se por que não ocorram efeitos adversos decorrentes da exposição acumulada (*cf.* ponto 127). O que precede é especialmente importante caso se ensaiem várias substâncias em simultâneo (*cf. ponto* 112).

O alimento dos peixes pode ser enriquecido com a quantidade adequada de substância em estudo por uma de três formas, como descrito no ponto 119 e no apêndice 7. Os métodos e procedimentos de enriquecimento da alimentação devem ser documentados no relatório. Os peixes do lote de controlo são alimentados com um alimento não tratado que contenha uma quantidade equivalente de óleo/excipiente não enriquecido — caso este tenha sido utilizado na alimentação enriquecida durante a fase de fixação — ou tratado com solvente puro, caso se tenha utilizado um solvente como excipiente na preparação da dieta do grupo de ensaio. Ambas as dietas, com e sem tratamento, devem ser analisadas, pelo menos, em triplicado, para determinar a concentração da substância em estudo antes do início e no final da fase de fixação. Após a exposição aos alimentos tratados (fase de fixação), os peixes de ambos os grupos são alimentados com alimento não tratado (fase de depuração).

Os peixes são alimentados com uma ração fixa, de acordo com a espécie (p. ex., cerca de 1-2 % da massa corporal húmida, por dia no caso da truta-arco-íris). A taxa de alimentação deve ser selecionada de modo a evitar o crescimento rápido e

([1]) Uma vez que as concentrações internas reais só podem ser determinadas depois da realização do ensaio, é necessário efetuar uma estimativa das concentrações internas previstas (p. ex., com base no BMF previsto e na concentração nos alimentos; *cf.* equação A5.8 no apêndice 5).

▼M7

um grande aumento do teor de lípidos. Deve registar-se a taxa de alimentação exata definida para a experiência. A alimentação inicial deve basear-se nas pesagens programadas da população de reserva imediatamente antes do início do ensaio. A quantidade de alimentos deve ser ajustada em função da massa húmida dos peixes amostrados em cada colheita, para ter em conta o crescimento durante a experiência. O peso e o comprimento dos peixes nos tanques de ensaio e de controlo podem ser estimados a partir do peso e do comprimento total dos peixes recolhidos em cada amostragem; não se devem pesar nem medir os peixes que permanecem nos tanques de ensaio e de controlo. É importante manter a mesma taxa de alimentação durante toda a experiência.

Deve vigiar-se a alimentação para assegurar que os peixes consomem claramente todo o alimento oferecido, de forma a garantir a utilização de taxas de ingestão adequadas nos cálculos. A seleção de uma taxa de alimentação que garanta o consumo total dos alimentos fornecidos diariamente deve ter em conta eventuais experiências preliminares de alimentação ou a experiência adquirida. Caso se verifique que permanecem sistematicamente alimentos por ingerir, pode ser recomendável fornecer uma parte da dose num período de alimentação adicional em cada dia (por exemplo, substituir a alimentação fornecida uma vez por dia por metade da mesma quantidade duas vezes por dia). Caso seja necessária, a segunda alimentação deve ocorrer a uma determinada hora e ser cronometrada para que decorra o período máximo possível antes da recolha dos peixes para amostra (p. ex., definindo o momento da segunda alimentação na primeira metade do dia experimental).

Embora, em geral, os peixes consumam os alimentos rapidamente, é importante garantir que a substância em estudo permanece adsorvida nos mesmos. Devem envidar-se esforços para evitar que a substância se disperse na água a partir dos alimentos, expondo assim os peixes a concentrações aquosas da substância em estudo para além da via alimentar. Isso é possível mediante a remoção de todo o alimento não ingerido (e das fezes) dos tanques de ensaio e de controlo na hora subsequente à alimentação — de preferência, nos 30 minutos seguintes. Além disso, pode utilizar-se um sistema no qual a água é constantemente limpa por recurso a um filtro de carvão ativado, para absorver qualquer contaminante dissolvido. Os sistemas dinâmicos podem ajudar a escoar rapidamente as partículas de alimentos e as substâncias dissolvidas ([1]). Em alguns casos, o recurso a uma técnica de preparação dos alimentos enriquecidos ligeiramente alterada pode contribuir para atenuar este problema (ver ponto 119).

Luz e temperatura

Tal como no método de exposição por via aquosa (*cf.* ponto 48), recomenda-se um fotoperíodo de 12 a 16 horas e uma temperatura (± 2 °C) adequada à espécie de ensaio utilizada (*cf.* apêndice 3). O tipo e as características da iluminação devem ser conhecidos e documentados.

Controlos

Deve utilizar-se um grupo de controlo constituído por peixes alimentados com a mesma ração que no caso do grupo de ensaio, mas sem a substância em estudo. Caso se utilize um óleo ou solvente como excipiente para enriquecer a alimentação no grupo de ensaio, o alimento do grupo de controlo deve ser tratado exatamente da mesma forma, mas sem a substância em estudo, para que as dietas do grupo de ensaio e do grupo de controlo sejam equivalentes (*cf.* pontos 121 e 139).

([1]) A presença da substância em estudo no meio de ensaio em consequência das excreções dos peixes ou da lixiviação dos alimentos pode não ser completamente evitável. Como alternativa, pode determinar-se a concentração da substância na água no final do período de fixação, especialmente se se utilizar uma instalação semiestática, para ajudar a determinar se ocorreu exposição aquosa.

▼M7

Frequência das determinações da qualidade da água

As condições descritas no método de exposição aquosa também são aplicáveis neste caso, exceto o facto de apenas ser necessário determinar o COT antes do ensaio como parte da caracterização da água de ensaio (*cf.* ponto 53).

Amostragem e análise dos peixes e da dieta

Análise de amostras da dieta

As amostras das dietas de ensaio e de controlo devem ser analisadas, pelo menos, em triplicado, para determinar a presença da substância em estudo e o teor de lípidos, pelo menos, antes do início e no final da fase de fixação. Os métodos de análise e os procedimentos para garantir a homogeneidade da dieta devem ser registados no relatório.

As amostras devem ser analisadas pelo método estabelecido e validado para determinar a presença da substância em estudo. Deve efetuar-se um trabalho prévio ao estudo para determinar o limite de quantificação, a percentagem de recuperação, as eventuais interferências e a variabilidade analítica na matriz da amostra pretendida. Caso se utilize uma substância com marcação radioativa, devem ser tidos em conta os mesmos aspetos que no método de exposição aquosa, sendo que a análise da alimentação substitui a análise da água (*cf.* ponto 65).

Análise dos peixes

Em cada amostragem, são recolhidos entre 5 e 10 peixes dos tratamentos de exposição e de controlo (em alguns casos, o número de peixes do lote de controlo pode ser reduzido; *cf.* ponto 134).

Em cada dia experimental, as colheitas de amostras devem ser efetuadas no mesmo momento em relação à hora da alimentação e ser cronometradas de modo a minimizar a probabilidade da permanência de alimento nos intestinos durante a fase de fixação e a parte inicial da fase de depuração, com vista a evitar contributos falsos para as concentrações totais da substância em estudo (os peixes que constituem as amostras devem ser removidos no final de cada dia experimental, não esquecendo que este tem início no momento da alimentação e termina no momento da alimentação seguinte, cerca de 24 horas depois. A depuração tem início com a primeira alimentação não enriquecida; *cf.* ponto 128). A primeira amostra da fase de depuração — recolhida pouco antes da segunda alimentação não enriquecida — é importante porque a extrapolação para o dia anterior a esta medição é utilizada para estimar a concentração no instante zero ($C_{0,d}$, a concentração nos peixes no final da fixação/início da depuração). Facultativamente, o aparelho digestivo dos peixes pode ser removido e analisado em separado no final da fase de fixação e nos dias 1 e 3 da depuração.

Em cada colheita de amostra, devem remover-se peixes de ambos os recipientes de ensaio, sendo os peixes tratados de forma idêntica à descrita no método aquoso (*cf.* pontos 61-63).

As concentrações da substância em estudo nos peixes inteiros (massa húmida) são determinadas, pelo menos, no final da fase de fixação e durante a fase de depuração, tanto no grupo de controlo como no grupo de ensaio. Durante a fase de depuração, recomendam-se quatro a seis pontos de amostragem (por exemplo, nos dias 1, 3, 7, 14 e 28). Facultativamente, pode incluir-se um ponto de amostragem adicional após 1-3 dias de fixação, para estimar a eficiência de assimilação da fase linear de fixação, enquanto os peixes ainda se encontram quase no início do período de exposição. São possíveis dois desvios ao calendário: i) se se utilizar uma fase de fixação prolongada para efeitos de investigação da cinética de fixação, haverá pontos de amostragem adicionais durante a fase de fixação, pelo que será necessário utilizar um número mais elevado de peixes (*cf.* ponto 126); ii) se o estudo tiver sido concluído no final da fase de fixação

▼M7

devido à ausência de fixação quantificável (*cf.* ponto 131). Cada peixe recolhido para amostra deve ser pesado e o respetivo comprimento total medido, para permitir a determinação das constantes de velocidade de crescimento. Também é possível determinar as concentrações da substância em tecidos específicos dos peixes (porções comestíveis e não comestíveis) no final da fixação e em pontos selecionados no decurso da depuração. Caso se ensaie uma substância com marcação radioativa, devem ser tidos em os mesmos aspetos que no método de exposição aquosa, sendo que a análise da alimentação substitui a análise da água (*cf.* ponto 65).

No que diz respeito à utilização periódica de uma substância de referência (*cf.* ponto 25), é preferível que, no grupo de ensaio, as concentrações sejam determinadas no final da fixação e em todos os pontos do processo de depuração especificados para a substância em estudo (peixe inteiro); só é necessário analisar as concentrações no grupo de controlo no final da fixação (peixe inteiro). Em determinadas circunstâncias — p. ex., se as técnicas de análise para a substância em estudo e para a substância de referência forem incompatíveis, sendo necessária a utilização de peixes adicionais para cumprir o calendário de amostragem —, é possível utilizar outra metodologia, do modo que se segue, para minimizar o número de peixes adicionais necessários. As concentrações da substância de referência são determinadas durante a depuração apenas nos dias 1, 3 e em dois pontos de amostragem adicionais, selecionados de modo a que seja possível estabelecer estimativas fiáveis da concentração do instante zero ($C_{0,d}$) e de k_2 para a substância de referência.

Se possível, o teor de lípidos de cada peixe deve ser determinado em cada ponto de amostragem ou, pelo menos, no início e no final da fase de fixação e no final da fase de depuração. (*cf.* pontos 56 e 67). Consoante o método analítico (consultar ponto 67 e apêndice 4), pode ser possível utilizar os mesmos peixes para determinar tanto o teor de lípidos como a concentração da substância em estudo, o que é preferível para minimizar o número de peixes. Todavia, caso tal não seja possível, pode utilizar-se a metodologia descrita no método de exposição aquosa (ver ponto 56 para estas opções alternativas de determinação do teor de lípidos). O método utilizado para quantificar o teor de lípidos deve ser documentado no relatório.

Qualidade do método analítico

Devem realizar-se verificações experimentais para garantir a especificidade, exatidão, precisão e reprodutibilidade da técnica analítica específica da substância, bem como proceder a recuperações da substância em estudo, tanto a partir do alimento como dos peixes.

Determinação do crescimento dos peixes

No início do ensaio, é necessário pesar uma amostra de peixes da população de reserva e medir o comprimento total dos mesmos. Estes peixes devem ser recolhidos para amostra pouco antes (p. ex., uma hora) da primeira alimentação enriquecida e atribuídos ao dia experimental 0. O número de peixes para esta amostra deve ser, pelo menos, igual ao utilizado nas amostras de ensaio. Alguns deles podem ser os mesmos peixes utilizados para a análise do teor de lípidos antes do início da fase de fixação (*cf.* ponto 153). Em cada intervalo de amostragem, os peixes são, antes de mais, pesados e o respetivo comprimento total medido. Em cada peixe individual, o peso determinado — e o comprimento — devem ser relacionados com a concentração obtida na análise do produto químico (e com o teor de lípidos, se pertinente), por exemplo, através de um código de identificação único para cada peixe recolhido. As medições destes peixes recolhidos para amostra podem ser utilizadas para estimar o peso e o comprimento dos peixes que permanecem nos tanques de ensaio e de controlo.

Avaliação experimental

As observações da mortalidade devem ser efetuadas e registadas diariamente. Devem realizar-se observações adicionais para a pesquisa de efeitos adversos — por exemplo, para verificar a ocorrência de comportamento ou pigmentação anormais —, que devem ser registadas. Considera-se que os peixes estão mortos se não se verificar movimento respiratório nem se detetar qualquer reação a um ligeiro estímulo mecânico. Todos os peixes mortos ou claramente moribundos devem ser removidos.

▼M7

DADOS E RELATÓRIOS

Tratamento dos resultados

Os resultados dos ensaios são utilizados para obter a constante de velocidade de depuração (k_2) em função da massa húmida total dos peixes. A constante de velocidade de crescimento, k_g, com base no aumento médio do peso dos peixes, é calculada e utilizada para obter a constante de velocidade de depuração corrigida em função do crescimento, k_{2g}, se adequado. Além disso, deve registar-se a eficiência de assimilação a (absorção a partir do intestino), o fator de bioamplificação cinético (BMF_K) — se necessário, corrigido em função do crescimento, BMF_{Kg} —, o respetivo valor corrigido em função dos lípidos (BMF_{KL} ou BMF_{KgL}, se corrigido em função da diluição de crescimento) e a taxa de alimentação. Além disso, se for possível efetuar uma estimativa do surgimento do estado estacionário na fase de fixação (por exemplo, 95 % do estado estacionário ou $t_{95} = 3{,}0/k_2$), pode incluir-se uma estimativa do BMF do estado estacionário (BMF_{SS}) (*cf.* pontos 105 e 106 e apêndice 5) se o valor t_{95} indicar a possibilidade de terem sido atingidas as condições do estado estacionário. Deve aplicar-se a este BMF_{SS} a mesma correção em função dos lípidos aplicada ao BMF obtido por via cinética (BMF_K) para obter um valor corrigido em função dos lípidos, BMF_{SSL} (importa salientar que não existe nenhum procedimento normalizado para corrigir um BMF do estado estacionário em função da diluição de crescimento). As fórmulas e os exemplos de cálculos constam do apêndice 7. Encontram-se disponíveis metodologias que tornam possível estimar um fator de bioconcentração cinético (BCF_K) a partir de dados gerados no estudo relativo à via alimentar. Vide o apêndice 8.

Dados sobre o peso/comprimento dos peixes

A massa húmida e o comprimento de cada peixe em todos os períodos são apresentados separadamente, sob a forma de quadro, no respeitante aos grupos de ensaio e de controlo, para todos os dias de amostragem durante a fase de fixação (população de reserva para o início da fixação; grupo de controlo e grupo de ensaio para o final da fixação e, se realizada, a fase inicial (por exemplo, dia 1-3 da fixação) e a fase de depuração (por exemplo, dias 1, 2, 4, 7, 14, 28, para os grupos de controlo e de ensaio). O peso é a medida de crescimento preferível para efeitos de correção em função da diluição de crescimento. Ver os pontos 162 e 163 e o apêndice 5 no respeitante ao método, ou aos métodos, utilizados para corrigir os dados em função da diluição de crescimento.

Dados relativos à concentração da substância em estudo nos peixes

As medições dos resíduos da substância em estudo em cada peixe (ou em amostras de peixes combinadas, caso não sejam possíveis medições individuais), expressas em concentração relativamente à massa húmida (p/p), são apresentadas, na forma de quadro, para os peixes de controlo e os peixes de ensaio, para cada ponto de amostragem. Caso se tenha determinado o teor de lípidos em cada peixe recolhido para amostra, é possível obter e apresentar na forma de quadro as concentrações individuais corrigidas em função dos lípidos, expressas em concentração ponderal de lípidos.

— As medições dos resíduos da substância em estudo em cada peixe (ou nas amostras combinadas de peixes, caso não sejam possíveis medições individuais — *cf.* ponto 66), para o período de depuração, são convertidas nos seus logaritmos naturais e representadas graficamente em função do tempo (dia). Se uma inspeção visual da representação gráfica revelar valores anómalos evidentes, é possível aplicar um teste estatisticamente válido aos valores anómalos para eliminar dados espúrios e apresentar uma justificação documentada para a sua omissão.

— Procede-se a uma análise de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados, dos dados relativos ao logaritmo natural da concentração em função dos dados de depuração (dia). O declive e a ordenada na origem são registados como constante de velocidade de depuração global (k_2) e logaritmo natural da concentração obtida no instante zero ($C_{0,d}$) — ver os apêndices 5 e 7 para informações adicionais. Caso tal não seja possível por as concentrações serem inferiores ao limite de quantificação para a segunda amostra da depuração, pode efetuar-se uma estimativa prudente de k_2 (*cf.* apêndice 7).

— Calculam-se as variâncias do declive e da ordenada na origem por processos estatísticos normais e avaliam-se e apresentam-se os intervalos de confiança a 90 % (ou 95 %) em torno destes resultados.

▼M7

— A concentração média determinada nos peixes para o último dia de fixação (concentração determinada no instante zero, $C_{0,m}$) é também calculada e comparada com o valor $C_{0,d}$ obtido. Se o valor calculado for inferior ao valor medido, a diferença pode sugerir a presença de alimento enriquecido não digerido nos intestinos. Se o valor calculado for muito superior ao valor medido, tal pode indicar que o valor obtido a partir da regressão linear dos dados relativos à depuração é incorreto e deve ser reavaliado (ver apêndice 7).

Velocidade de depuração e fator de bioamplificação

Para calcular o fator de bioamplificação a partir dos dados, é necessário, antes de mais, obter a eficiência de assimilação (absorção da substância em estudo no intestino, α). Para tal, utiliza-se a equação A7.1 que consta do apêndice 7, sendo necessário conhecer a concentração obtida nos peixes no instante zero da fase de depuração ($C_{0,d}$), a constante de velocidade de depuração (global) (k_2), a concentração no alimento ($C_{alimento}$), a constante de velocidade de ingestão do alimento (I) e a duração do período de fixação (t). O declive e a ordenada na origem da relação linear entre o logaritmo natural da concentração e o tempo de depuração são registados como constante de velocidade de depuração global (k_2 = declive) e concentração do instante zero ($C_{0,d} = e^{ordenada}$), como referido supra. Os valores obtidos devem ser verificados para determinar a sua plausibilidade biológica (por exemplo, a eficiência de assimilação como fração não deve ser superior a 1). *(I)* é calculada mediante a divisão da massa de alimento pela massa de peixes alimentados por dia (se alimentados com 2 % do peso corporal, (*I*) será 0,02). Contudo, pode ser necessário ajustar a taxa de alimentação utilizada no cálculo em função do crescimento dos peixes (pode recorrer-se à constante de velocidade de crescimento conhecida para estimar o peso dos peixes em cada momento durante a fase de fixação; *cf.* apêndice 7). Sempre que não seja possível obter k_2 e $C_{0,d}$ porque, por exemplo, as concentrações da segunda amostra de depuração são inferiores ao limite de deteção, pode efetuar-se uma estimativa prudente de k_2 e de um «limite superior» do BMF_k (*cf.* apêndice 7).

Depois de obtida a eficiência de assimilação (α), é possível calcular o fator de bioamplificação através da multiplicação de α pela constante de velocidade de ingestão (I) e da divisão pela constante de velocidade de depuração (global) (k_2). O fator de bioamplificação corrigido em função do crescimento é calculado da mesma forma, mas com a constante de velocidade de depuração corrigida em função do crescimento (k_{2g}; *cf.* pontos 162 e 163. É possível obter uma estimativa alternativa da eficiência de assimilação se a análise dos tecidos tiver sido realizada em peixes recolhidos para amostra na fase linear inicial da fase de fixação — ver o ponto 151 e o apêndice 7. Este valor representa uma estimativa independente da eficiência de assimilação para um organismo essencialmente não exposto (*ou seja,* os peixes encontram-se quase no início da fase de fixação). A eficiência de assimilação estimada a partir dos dados de depuração é normalmente utilizada para obter o BMF.

Correção em função dos lípidos e correção em função da diluição de crescimento

O crescimento dos peixes durante a fase de depuração pode reduzir as concentrações de produto químico determinadas nos peixes, tornando a constante de velocidade de depuração global, k_2, superior ao que se verificaria apenas nos processos de remoção (por exemplo, metabolismo, defecação) (*cf.* ponto 72). Na prática, o teor de lípidos dos peixes de ensaio — que se encontra fortemente associado à bioacumulação de substâncias hidrófobas — e o teor de lípidos dos alimentos podem variar o suficiente para que seja necessário efetuar uma correção em função dos mesmos, de modo a que os fatores de bioamplificação sejam apresentados de uma forma significativa. O fator de bioamplificação deve ser corrigido em função da diluição de crescimento (tal como o BCF cinético no método de exposição aquosa) e em função do teor de lípidos dos alimentos relativamente ao dos peixes (fator de correção em função dos lípidos). Os apêndices 5 e 7, respetivamente, apresentam equações e exemplos destes cálculos.

Para efetuar uma correção em função da diluição de crescimento, deve calcular-se a constante de velocidade de depuração corrigida em função do crescimento

▼M7

(k_{2g}) (ver apêndice 5 para equações). A constante de velocidade de depuração corrigida é posteriormente utilizada para calcular o fator de bioamplificação corrigido em função do crescimento, tal como no ponto 73. Em alguns casos, esta metodologia não é viável. Uma metodologia alternativa, que contorna a necessidade da correção em função da diluição de crescimento, implica a utilização de dados de depuração relativos à massa da substância em estudo por peixe (com base no peixe inteiro), ao invés dos dados (de concentração) relativos à massa normal da substância em estudo por unidade de massa de peixe. Tal pode ser facilmente alcançado, uma vez que os ensaios realizados em conformidade com este método devem relacionar as concentrações registadas nos tecidos com o peso de cada peixe. O procedimento simples para realizar o que precede encontra-se descrito no apêndice 5. Todavia, importa salientar que se deve estimar e registar k_2, mesmo em caso de utilização da metodologia alternativa.

Para efetuar uma correção em função do teor de lípidos dos alimentos e dos peixes nos casos em que não se tenha efetuado uma análise dos lípidos em todos os peixes recolhidos para amostra, são obtidas as frações médias de lípidos (p/p) nos peixes e nos alimentos ([1]). Subsequentemente, calcula-se o fator de correção em função dos lípidos (L_c) através da divisão da fração média de lípidos dos peixes pela fração média de lípidos dos alimentos. O fator de bioamplificação, corrigido ou não em função do crescimento, consoante pertinente, é dividido pelo fator de correção em função dos lípidos para calcular o fator de bioamplificação corrigido em função dos lípidos.

Caso as análises da substância em estudo e dos lípidos sejam realizadas nos mesmos peixes em cada ponto de amostragem, é possível utilizar os dados relativos aos tecidos, corrigidos em função do teor de lípidos dos peixes individuais, para calcular diretamente um BMF corrigido em função dos lípidos (*cf.* (37)). A representação gráfica dos dados de concentração corrigidos em função dos lípidos fornece o valor $C_{0,d}$ relativamente aos lípidos e o valor k_2. A análise matemática pode então utilizar as mesmas equações constantes do apêndice 7, mas a eficiência de assimilação (a) é calculada com a constante de velocidade de ingestão de alimentos normalizada em função dos lípidos ($I_{\text{lípidos}}$) e a concentração alimentar com base nos lípidos ($C_{\text{alimentos-lípidos}}$). Subsequentemente, são utilizados, de forma semelhante, parâmetros corrigidos em função dos lípidos para calcular o BMF (importa salientar que a correção em função da constante de velocidade de crescimento também deve ser aplicada à fração de lípidos e não à massa húmida dos peixes para calcular o BMF_{KgL} corrigido em função dos lípidos e do crescimento).

Interpretação dos resultados

Para excluir efeitos tóxicos, o crescimento médio nos grupos de ensaio e de controlo não deve, em princípio, ser significativamente diferente. As constantes de velocidade de crescimento ou as curvas de crescimento dos dois grupos devem ser comparadas por um procedimento adequado ([2]).

Relatório de ensaio

Após a conclusão do estudo, elabora-se um relatório final com as informações sobre a *substância em estudo*, *a espécie utilizada no ensaio* e *as condições do ensaio*, tal como enumeradas no ponto 81 (como para o método de exposição aquosa). Além disso, são necessárias as seguintes informações:

Substância em estudo:

— Todas as informações relativas à estabilidade da substância em estudo nos alimentos preparados;

([1]) Esta metodologia é específica do estudo alimentar, diferente do procedimento seguido na exposição aquosa; daí a utilização do vocábulo «correção» em vez de «normalização» para evitar confusões — ver também a nota de rodapé no ponto 106.

([2]) É possível efetuar um teste t às constantes de velocidade de crescimento, de modo a determinar se o crescimento difere entre os grupos de ensaio e de controlo, ou um teste F em caso de análise da variância. Se necessário, é possível utilizar um teste F ou um teste de rácio da verosimilhança para ajudar na seleção do modelo de crescimento adequado (monografia da OCDE, 54, (32)).

▼M7

Condições de ensaio:

— Concentração nominal da substância no alimento, técnica de enriquecimento, quantidade de excipiente (de lípidos) utilizada no processo de enriquecimento do alimento (se pertinente), determinações da concentração da substância em estudo na dieta enriquecida para cada análise (pelo menos em triplicado antes do início do estudo e no final da fixação) e valores médios;

— Se for o caso, tipo e qualidade do solvente ou óleo utilizado como excipiente (qualidade, fornecedor, etc.) para o enriquecimento do alimento;

— Tipo de alimento utilizado (análise imediata [1]), qualidade, fornecedor, etc.), taxa de alimentação durante a fase de fixação, quantidade de alimento administrada e frequência da administração (incluindo quaisquer ajustamentos com base no peso dos peixes recolhidos para amostra);

— Hora a que os peixes foram recolhidos e eutanasiados para efeitos de análise química, para cada ponto de amostragem (por exemplo, uma hora antes da alimentação do dia seguinte);

Resultados:

— Resultados de quaisquer trabalhos preliminares do ensaio;

— Informações sobre quaisquer efeitos adversos observados;

— Descrição completa de todos os procedimentos de análise química utilizados, nomeadamente limites de deteção e quantificação, variabilidade e recuperação;

— Concentrações de lípidos determinadas nos alimentos (dieta enriquecida e de controlo) — valores individuais, médias e desvios-padrão;

— Quadros com dados sobre o peso — e comprimento — dos peixes, para cada espécime, tanto no que respeita aos grupos de controlo e como aos grupos de exposição (por exemplo, utilizando identificadores únicos para cada peixe); cálculos, constante(s) de velocidade de crescimento obtida(s) e intervalo(s) de confiança a 95 %;

— Quadros com dados sobre a concentração da substância em estudo nos peixes, a concentração média determinada no final da fixação ($C_{0,m}$) e a constante de velocidade de depuração (global) obtida (k_2), bem como a concentração nos peixes no início da fase de depuração ($C_{0,d}$), juntamente com as variâncias destes valores (declive e ordenada na origem);

— Quadros com dados sobre o teor de lípidos dos peixes (ordenados em função das concentrações específicas da substância, se pertinente), os valores médios respeitantes ao grupo de ensaio e ao grupo de controlo no início do ensaio, no final da fixação e no final da depuração;

— Curvas (incluindo todos os dados determinados) que ilustrem os seguintes parâmetros (se pertinente, as concentrações podem ser expressas em relação ao corpo inteiro do animal ou a determinados tecidos do mesmo):

  — crescimento (*ou seja,* peso dos peixes — e comprimento — em função do tempo) ou logaritmo natural do peso em função do tempo;

[1] Técnica de análise dos alimentos no que respeita às proteínas, aos lípidos, à fibra bruta e ao teor de cinzas; em regra, o fornecedor do alimento disponibiliza estas informações.

▼M7

— depuração da substância em estudo nos peixes; e

— logaritmo natural da concentração em função do tempo de depuração (incluindo a constante de velocidade de depuração obtida, k_2, e o logaritmo natural da concentração obtida nos peixes no início da fase de depuração, $C_{0,d}$).

— Se uma inspeção visual de uma representação gráfica revelar valores anómalos evidentes, é possível aplicar um teste estatisticamente válido a estes valores, para eliminar dados espúrios e apresentar uma justificação documentada para a sua omissão.

— O cálculo da constante de velocidade de depuração corrigida em função do crescimento e da semivida corrigida em função do crescimento.

— Eficiência de assimilação calculada (α).

— BMF «bruto» por via alimentar, BMF cinético corrigido em função do crescimento e dos lípidos («bruto» e corrigido em função dos lípidos com base na massa húmida do peixe inteiro) e BMF específico dos tecidos, se pertinente.

— Quaisquer informações relativas aos metabolitos da substância em estudo com marcação radioativa e à respetiva acumulação.

— Devem referir-se quaisquer ocorrências especiais registadas no decurso do ensaio, bem como quaisquer desvios relativamente ao procedimento ou outras informações de relevo.

— Um quadro recapitulativo dos dados calculados e medidos pertinentes, como:

Constantes de velocidade de depuração da substância e fatores de bioamplificação (BMF_K)	
k_g (constante de velocidade de crescimento; dia^{-1}):	Inserir valor (IC 95 %) ([1])
k_2 (constante de velocidade de depuração global; dia^{-1}):	Inserir valor (IC 95 %)
k_{2g} (constante de velocidade de depuração corrigida em função do crescimento; dia^{-1}):	Inserir valor (IC 95 %) ([1])
$C_{0,m}$ (concentração determinada no instante zero, a concentração nos peixes no final da fixação) (µg/g):	Inserir valor ± SD ([2])
$C_{0,d}$ (concentração obtida no instante zero da fase de depuração; µg/g):	Inserir valor ± SD ([2])
I (taxa de ingestão da alimentação definida; g alimento/g peixes/dia):	Inserir valor
I_g (taxa de alimentação real, ajustada em função do crescimento; g alimento/g peixes/dia) ([2]):	Inserir valor ± SD ([2])
$C_{alimento}$ (concentração da substância química no alimento; µg/g):	Inserir valor ± SD ([2])
α (eficiência de assimilação da substância):	Inserir valor ± SD ([2])
BMF_K (BMF cinético por via alimentar):	Inserir valor (IC 95 %) ([1])
BMF_{Kg} (BMF cinético por via alimentar corrigido em função do crescimento):	Inserir valor (IC 95 %) ([1])

▼**M7**

Constantes de velocidade de depuração da substância e fatores de bioamplificação (BMF_K)	
$t_{1/2g}$ (semivida, em dias, corrigida em função do crescimento):	Inserir valor ± SD ([2])
*L*c (fator de correção em função dos lípidos):	Inserir valor
BMF_{KgL} (BMF cinético corrigido em função do crescimento e dos lípidos):	Inserir valor
$BMF_{SS\text{-}L}$ (BMF indicativo do estado estacionário corrigido em função dos lípidos) ([2]):	Inserir valor ± SD ([2])

([1]) IC: intervalo de confiança (sempre que a estimativa seja possível)
([2]) SD: Desvio-padrão (sempre que a estimativa seja possível)

REFERÊNCIAS

1) Capítulo C.13 do presente anexo: *Bioconcentração: ensaio dinâmico com peixe*.

2) Capítulo A.6 do presente anexo: *Solubilidade em água*

3) Li A, Doucette W.J. (1993), The effect of cosolutes on the aqueous solubilities and octanol/water partition coefficients of selected polychlorinated biphenyl congeners. Environ Toxicol Chem 12: 2031-2035

4) Capítulo A.8 do presente anexo: *Coeficiente de partição (n-octanol/água): método do frasco agitado.*

5) Capítulo A.24 do presente anexo: *Coeficiente de partição (n-octanol/água), método por HPLC.*

6) Capítulo A.23 do presente anexo: *Coeficiente de partição (1-octanol/água): método de agitação lenta.*

7) Capítulo C.7 do presente anexo: *Hidrólise em função do pH.*

8) OCDE (1997), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment Number 7: Guidance Document on Direct Phototransformation of Chemicals in Water OCDE/GD(97)21. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.

9) Capítulo A.5 do presente anexo: *Tensão superficial de soluções aquosas.*

10) Capítulo A.4 do presente anexo: *Pressão de vapor.*

11) Capítulo C.4 do presente anexo: *Biodegradabilidade «fácil»*

12) Capítulo C.29 do presente anexo: *Biodegradabilidade «fácil» — CO_2 em recipientes fechados*

13) Connell D.W. (1988), Bioaccumulation behaviour of persistent chemicals with aquatic organisms. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 102: 117-156.

14) Bintein S., Devillers J. and Karcher W. (1993), Nonlinear dependence of fish bioconcentration on *n*-octanol/water partition coefficient. SAR QSAR Environ. Res. 1: 29-39.

15) OCDE (2011), QSAR Toolbox 2.1. February 2011. Available from: http://www.oecd.org/document/54/0,3746,en_2649_34379_42923638_1_1_1_1,00.html.

▼M7

16) Brown R.S., Akhtar P., Åkerman J., Hampel L., Kozin I.S., Villerius L.A. and Klamer H.J.C. (2001), Partition controlled delivery of hydrophobic substances in toxicity tests using poly(dimethylsiloxane) (PDMS) films. Environ. Sci. Technol. 35: 4097-4102.

17) Fernandez J.D., Denny J.S. and Tietge J.E. (1998), A simple apparatus for administering 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin to commercially available pelletized fish food. Environ. Toxicol. Chem. 17: 2058-2062.

18) Nichols J.W., Fitzsimmons P.N., Whiteman F.W. and Dawson T.D. (2004), A physiologically based toxicokinetic model for dietary uptake of hydrophobic organic compounds by fish: I. Feeding studies with 2,2′, 5,5′-tetrachlorobiphenyl. Toxicol. Sci. 77: 206-218.

19) Parkerton T.F., Arnot J.A., Weisbrod A.V., Russom C., Hoke R.A., Woodburn K., Traas T., Bonnell M., Burkhard L.P. and Lampi M.A. (2008), Guidance for evaluating *in vivo* fish bioaccumulation data. Integr. Environ. Assess. Manag. 4: 139-155.

20) Verbruggen E.M.J., Beek M., Pijnenburg J. and Traas T.P. (2008). Ecotoxicological environmental risk limits for total petroleum hydrocarbons on the basis of internal lipid concentrations. Environ. Toxicol. Chem. 27: 2436-2448.

21) Schlechtriem C., Fliedner A. and Schäfers C. (2012), Determination of lipid content in fish samples from bioaccumulation studies: Contributions to the revision of OECD Test Guideline 305. Environmental Sciences Europe 2012, 24:13. published: 3 April 2012.

22) Capítulo C.47 do presente anexo: *Ensaio de toxicidade nos primeiros estádios de vida em peixes.*

23) Capítulo C.15 do presente anexo: *Ensaio de toxicidade de curto prazo nos peixes em estado embrionário e recém-nascidos.*

24) Capítulo C.14 do presente anexo: *Ensaio de crescimento juvenil em peixe.*

25) OCDE (2000), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 23: Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures ENV/JM/MONO(2000)6. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.

26) US-EPA (1994), Great Lake water quality initiative technical support document for the procedure to determine bioaccumulation factors 822-R-94-002. US EPA, Office of Water, Office of Science and Technology, Washington, DC, USA.

27) US-FDA (1999), Pesticide analytical manual (PAM). Vol.1. US Food and Drug Administration, Rockville, MD, USA.

28) US-EPA (1974), Section 5, A (1) Analysis of Human or Animal Adipose Tissue, in Analysis of Pesticide Residues in Human and Environmental Samples, Thompson, J.F., Editor. US-EPA, Research Triangle Park, NC, USA

29) Bligh E.G. and Dyer W.J. (1959), A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37: 911-917.

30) Gardner W.S., Frez W.A., Cichocki E.A. and Parrish C.C. (1985), Micromethod for lipids in aquatic invertebrates. Limnol. Oceanogr. 30: 1099-1105.

31) Smedes F. (1999), Determination of total lipid using non-chlorinated solvents. Analyst. 124: 1711-1718.

32) OCDE (2006), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 54: Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. ENV/JM/MONO(2006)18. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.

▼M7

33) Springer T.A., Guiney P.D., Krueger H.O. and Jaber M.J. (2008), Assessment of an approach to estimating aquatic bioconcentration factors using reduced sampling. Environ. Toxicol. Chem. 27: 2271-2280.

34) Springer T.A. (2009), Statistical Research Related to Update of OECD Guideline 305. Wildlife International, Ltd, Easton, MD, USA.

35) Arnot J.A., Meylan W., Tunkel J., Howard P.H., Mackay D., Bonnell M. and Boethling R.S. (2009), A quantitative structure-activity relationship for predicting metabolic biotransformation rates for organic chemicals in fish. Environ. Toxicol. Chem. 28: 1168-1177.

36) Parkerton T., Letinski D., Febbo E., Davi R., Dzambia C., Connelly M., Christensen K. and Peterson D. (2001), A practical testing approach for assessing bioaccumulation potential of poorly water soluble organic chemicals (presentation). in SETAC Europe 12th Annual Meeting: Madrid, Spain.

37) Fisk A.T., Cymbalisty C.D., Bergman Ã. and Muir D.C.G. (1996), Dietary accumulation of C_{12}- and C_{16}-chlorinated alkanes by juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Environ. Toxicol. Chem. 15: 1775-1782.

38) Anónimo (2004), Fish, dietary bioaccumulation study — Basic protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.

39) Anónimo (2004), Background document to the fish dietary study protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.

40) Bruggeman W.A., Opperhuizen A., Wijbenga A. and Hutzinger O. (1984), Bioaccumulation of super-lipophilic chemicals in fish, Toxicol. Environ. Chem. 7: 173-189.

41) Muir D.C.G., Marshall W.K. and Webster G.R.B. (1985), Bioconcentration of PCDDs by fish: effects of molecular structure and water chemistry. Chemosphere. 14: 829-833.

42) Thomann R.V. (1989), Bioaccumulation model of organic chemical distribution in aquatic food chains. Environ. Sci. Technol. 23: 699-707.

43) Nichols J.W., Fitzsimmons P.N. and Whiteman F.W. (2004), A physiologically based toxicokinetic model for dietary uptake of hydrophobic organic compounds by fish: II. Stimulation of chronic exposure scenarios. Toxicol. Sci. 77: 219-229.

44) Gobas F.A.P.C., de Wolf W., Burkhard L.P., Verbruggen E. and Plotzke K. (2009), Revisiting bioaccumulation criteria for POPs and PBT assessments. Integr. Environ. Assess. Manag. 5: 624-637.

45) Sijm D.T.H.M. and van der Linde A. (1995), Size-dependent bioconcentration kinetics of hydrophobic organic chemicals in fish based on diffusive mass transfer and allometric relationships. Environ. Sci. Technol. 29: 2769-2777.

46) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. and Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined *in vivo* and in isolated perfused gills. Toxicol. Appl. Pharmacol. 131: 130-135.

47) Fisk A.T., Norstrom R.J., Cymbalisty C.D. and Muir D.G.G. (1998), Dietary accumulation and depuration of hydrophobic organochlorines: Bioaccumulation parameters and their relationship with the octanol/water partition coefficient. Environ. Toxicol. Chem. 17: 951-961.

48) McGrath J.A., Parkerton T.F. and Di Toro D.M. (2004), Application of the narcosis target lipid model to algal toxicity and deriving predicted-no-effect concentrations. Environ. Toxicol. Chem. 23: 2503-2517.

49) Poppendieck D.G. (2002), Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Desorption Mechanisms from Manufactured Gas Plant Site Samples. Dissertation. Department of Civil, Architectural and Environmental Engineering, University of Texas, Austin, TX, USA.

▼**M7**

50) McCarty L.S. and Mackay D. (1993), Enhancing ecotoxicological modelling and assessment: body residues and modes of toxic action. Environ. Sci. Technol. 27: 1718-1728.

51) OCDE (2012), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 175: Part I — Validation Report of a ring test for the OECD TG 305 dietary exposure bioaccumulation fish test. Part II — Additional Report including comparative analysis of trout and carp results ENV/JM/MONO(2012)20. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.

▼M7

Apêndice 1

DEFINIÇÕES E UNIDADES

A eficiência de assimilação (α) é uma medida da quantidade relativa de substância absorvida pelo organismo a partir do intestino (não tem unidade, mas é muitas vezes expressa como percentagem em vez de fração).

A bioacumulação é geralmente referida como um processo no qual a concentração da substância num organismo atinge um nível que ultrapassa o que se verifica no meio respiratório (por exemplo, água para um peixe ou ar para um mamífero), na dieta, ou em ambos (1).

A bioconcentração consiste no aumento da concentração da substância em estudo num determinado organismo ou em determinados tecidos do mesmo, relativamente à respetiva concentração no meio circundante.

O fator de bioconcentração (BCF ou K_B) em qualquer momento da fase de fixação do ensaio de acumulação consiste no quociente entre a concentração da substância em estudo nos peixes ou em determinados tecidos dos mesmos (C_f expressa em mg/kg) e a respetiva concentração no meio circundante (C_w, expressa em mg/l). O BCF é expresso em $l \cdot kg^{-1}$. Importa salientar que não são tidas em conta as correções em função do crescimento e/ou de um teor de lípidos normal.

A bioamplificação consiste no aumento da concentração da substância em estudo num determinado organismo ou em determinados tecidos do mesmo, relativamente à respetiva concentração nos alimentos.

O fator de bioamplificação (BMF) consiste na concentração de uma substância num predador em relação à concentração na presa (ou alimento) em estado estacionário. No método descrito no presente método de ensaio, evita-se cuidadosamente a exposição através da fase aquosa e, como tal, não é possível comparar diretamente um BMF deste método de ensaio com um BMF de um estudo de campo (que poderá combinar a exposição aquosa e a exposição por via alimentar).

O fator de bioamplificação por via alimentar (BMF por via alimentar) é o termo utilizado no presente método de ensaio para descrever o resultado do ensaio de exposição por via alimentar, no qual se evita cuidadosamente a exposição através da fase aquosa e, portanto, não é possível comparar diretamente o BMF por via alimentar deste método de ensaio com um BMF de um estudo de campo (que poderá combinar a exposição aquosa e a exposição por via alimentar).

A fase de depuração ou de pós-exposição consiste no período durante o qual se estuda a depuração da substância pelos peixes ou por tecidos específicos dos mesmos, na sequência da transferência dos animais de um meio que contenha a substância em estudo para um meio que a não contenha.

A constante de velocidade de depuração (k_2) é o valor numérico que define a velocidade de redução da concentração da substância em estudo nos peixes ou em determinados tecidos dos mesmos, na sequência da transferência dos animais de um meio que contenha a substância em estudo para um meio que a não contenha (a constante k_2 é expressa em $dias^{-1}$).

O carbono orgânico dissolvido (COD) é uma medida da concentração de carbono proveniente de fontes orgânicas dissolvidas nos meios de ensaio.

A fase de exposição ou de fixação consiste no tempo de exposição dos peixes à substância em estudo.

A taxa de ingestão de alimentos (I) é a quantidade média de alimentos ingeridos por cada peixe por dia, em relação ao peso corporal médio estimado dos peixes (expressa em termos de g alimento/g peixes/dia).

▼M7

O fator de bioconcentração cinético (BCF_K) é o rácio entre a constante de velocidade de fixação, k_1, e a constante de velocidade de depuração, k_2 (*isto é,* k_1/k_2 — ver as definições correspondentes no presente apêndice). Em princípio, o valor deve ser comparável com o BCF_{SS} (ver definição supra), mas podem ocorrer desvios se o estado estacionário não tiver sido bem definido ou caso se tenham aplicado correções em função do crescimento ao BCF cinético.

O fator de bioconcentração cinético normalizado em função dos lípidos (BCF_{KL}) é normalizado em relação a um peixe com um teor de lípidos de 5 %.

O fator de bioconcentração cinético corrigido em função do crescimento e normalizado em função dos lípidos (BCF_{KgL}) é normalizado em relação a um peixe com um teor de lípidos de 5 % e corrigido em função do crescimento durante o período de estudo, tal como descrito no apêndice 5.

O fator de bioconcentração do estado estacionário normalizado em função dos lípidos (BCF_{SSL}) é normalizado em relação a um peixe com um teor de lípidos de 5 %.

Uma substância multicomponentes é definida, para efeitos do REACH, como uma substância com mais do que um componente principal presente numa concentração entre 10 % e 80 % (p/p).

O coeficiente de partição octanol-água (K_{OW}) consiste no quociente entre a solubilidade de uma substância em *n*-octanol e em água, em condições de equilíbrio (métodos A.8 (2), A.24 (3), A.23 (4)); também é expresso como P_{OW}. O logaritmo de K_{OW} é utilizado como indicador do potencial de bioconcentração de uma substância em organismos aquáticos.

O carbono orgânico particulado (COP) é uma medida da concentração de carbono decorrente de fontes orgânicas suspensas nos meios de ensaio.

A microextração em fase sólida (SPME) é uma técnica analítica sem solventes desenvolvida para sistemas diluídos. Neste método, uma fibra revestida por um polímero é exposta à fase gasosa ou líquida com o analito de interesse. Em geral, impõe-se um tempo de análise mínimo para que se estabeleçam condições de equilíbrio entre as fases sólida e fluida, no que se refere à espécie medida. Subsequentemente, a concentração do analito de interesse pode ser diretamente determinada a partir da fibra ou após a sua extração da fibra para um solvente, consoante a técnica de determinação.

Um estado estacionário é atingido sempre que a representação gráfica da concentração da substância em estudo nos peixes (C_f) em função do tempo consista numa linha paralela ao eixo dos tempos e três determinações sucessivas de C_f em amostras recolhidas com intervalos de, pelo menos, dois dias, apresentem valores que não difiram em mais de 20 %, na ausência de diferenças significativas entre a primeira e a última análises sucessivas. No caso das amostras combinadas, são necessárias, pelo menos, quatro análises sucessivas. No caso de substâncias cuja fixação é lenta, o intervalo mais adequado é de sete dias.

O fator de bioconcentração num estado estacionário (BCF_{SS}) não sofre uma alteração significativa num período longo, uma vez que a concentração da substância em estudo no meio circundante é constante no período em causa (*cf.* definição de estado estacionário).

O carbono orgânico total (COT) é uma medida da concentração de carbono decorrente de todas as fontes orgânicas nos meios de ensaio, incluindo as fontes particuladas e dissolvidas.

A constante de velocidade de fixação (k_1) é o valor numérico que define a taxa de aumento da concentração da substância em estudo nos peixes ou em determinados tecidos dos mesmos, sempre que se encontrem expostos à substância em causa (a constante k_1 é expressa em $l\ kg^{-1}\ dia^{-1}$).

As substâncias de composição desconhecida ou variável, produtos de reação complexos e materiais biológicos são denominados UVCB.

▼**M7**

Um produto químico é uma substância ou mistura.

Um produto químico em estudo é qualquer substância ou mistura ensaiada por recurso ao presente método de ensaio.

REFERÊNCIAS

1) Gobas F.A.P.C., de Wolf W., Burkhard L.P., Verbruggen E. e Plotzke K. (2009), Revisiting bioaccumulation criteria for POPs and PBT assessments. Integr. Environ. Assess. Manag. 5: 624-637.

2) Capítulo A.8 do presente anexo, *Coeficiente de partição (n-octanol/água): Método de agitação do recipiente*

3) Capítulo A.24 do presente anexo, *Coeficiente de partição (n-octanol/água), Método de HPLC*.

4) Capítulo A.23 do presente anexo, *Coeficiente de partição (1-octanol/água): Método de agitação lenta*.

▼M7

Apêndice 2

ALGUMAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DE UMA ÁGUA DE DILUIÇÃO ACEITÁVEL

Componente	Concentração limite
Partículas	5 mg/l
Carbono orgânico total	2 mg/l
Amoníaco não ionizado	1 µg/l
Cloro residual	10 µg/l
Pesticidas organofosforados totais	50 ng/1
Total de pesticidas organoclorados + bifenilos policlorados	50 ng/1
Cloro orgânico total	25 ng/l
Alumínio	1 µg/l
Arsénio	1 µg/l
Crómio	1 µg/l
Cobalto	1 µg/l
Cobre	1 µg/l
Ferro	1 µg/l
Chumbo	1 µg/l
Níquel	1 µg/l
Zinco	1 µg/l
Cádmio	100 ng/l
Mercúrio	100 ng/l
Prata	100 ng/l

▼M7

Apêndice 3

ESPÉCIES DE PEIXES RECOMENDADAS PARA OS ENSAIOS

Espécies recomendadas	Gama de temperaturas de ensaio recomendadas (°C)	Comprimento recomendado dos animais de ensaio (cm) (2)
Danio rerio (1) (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) Peixe-zebra	20 - 25	3,0 ± 0,5
Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) Vairão-de-cabeça--grande	20 - 25	5,0 ± 2,0
Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus) Carpa comum	20 - 25	8,0 ± 4,0 (3)
Oryzias latipes (Teleostei, Poecilliidae) (Temminck e Schlegel) Peixinho--dos-arrozais	20 - 25	4,0 ± 1,0
Poecilia reticulata (Teleostei, Poeciliidae) (Peters) Gupi	20 - 25	3,0 ± 1,0
Lepomis macrochirus (Teleostei Centrarchidae) (Rafinesque) Perca-azul	20 - 25	5,0 ± 2,0
Oncorhynchus mykiss (Teleostei Salmonidae) (Walbaum) Truta-arco-íris	13 - 17	8,0 ± 4,0
Gasteroteus aculeatus (Teleostei, (Gasterosteidae) (Linnaeus) Esgana-gata	18 - 20	3,0 ± 1,0

(1) Meyer *et al.* (1)

(2) Importa salientar que no ensaio em si o peso é a medida preferível para derivações da constante de velocidade de crescimento e de dimensão. Todavia, reconhece-se que o comprimento é uma medida mais prática se for necessário selecionar os peixes a olho no início de uma experiência (*ou seja,* a partir da população de reserva).

(3) A gama de comprimentos encontra-se indicada no documento *Testing Methods for New Chemical Substances* etc., baseado na lei relativa ao controlo das produtos químicos do Japão.

Diversas espécies estuarinas e marinhas foram utilizadas com menor frequência, nomeadamente:

Roncadeira-de-pinta	(*Leiostomus xanthurus*)
Sargo-choupa	(*Cyprinodon variegatus*)
Peixe-rei	(*Menidia beryllina*)
Perca-brilhante	(*Cymatogaster aggregata*)
Solha-inglesa	(*Parophrys vetulus*)
Peixe-escorpião-armado	(*Leptocottus armatus*)
Esgana-gata	(*Gasterosteus aculeatus*)
Robalo	(*Dicentracus labrax*)
Alburno	(*Alburnus alburnus*)

▼**M7**

Os peixes de água doce referidos no quadro supra são de fácil reprodução, encontrando-se disponíveis todo o ano, ao passo que a disponibilidade de algumas das espécies marinhas e estuarinas se encontra limitada a determinados países. Os peixes de água doce podem ser criados em explorações piscícolas ou no laboratório, em condições controladas no que respeita a doenças e parasitas, de modo a produzir animais saudáveis com uma linha parental conhecida. Estas espécies encontram-se disponíveis em várias partes do mundo.

REFERÊNCIAS

1) Meyer A., Biermann C.H. and Orti G. (1993), The phylogenetic position of the zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology: An invitation to the comparative method Proc. R. Soc. Lond. B. 252: 231-236.

▼M7

Apêndice 4

CALENDÁRIOS DE AMOSTRAGEM PARA ENSAIOS DE EXPOSIÇÃO AQUOSA E POR VIA ALIMENTAR

1. **Exemplo teórico de um calendário de amostragem para um ensaio completo de bioconcentração de exposição aquosa com log K_{OW} = 4.**

Recolha de amostras de peixes	Calendário de amostragem		Número de amostras de água (1)	Número de peixes por amostra (1)
	Frequência mínima necessária (dias) (2)	Recolha de amostras adicionais (dias) (2)		
Fase de fixação				
1	-1		2 (3)	4 (4)
	0		(2)	(3 (6))
2	0,3		2	4
		0,4	(2)	(4)
3	0,6		2	4
		0,9	(2)	(4)
4	1,2		2	4
		1,7	(2)	(4)
5	2,4		2	4
		3,3	(2)	(4)
6	4,7		2	4 - 8 (5)
				(3 (6))
Fase de depuração				Transferência dos peixes para uma célula com água isenta da substância em estudo
7	5,0		2	4
		5,3		(4)
8	5,9		2	4
		7,0		(4)
9	9,3		2	4
		11,2		(4)
10	14,0		2	4 - 8 (5)
		17,5		(4 + 3 (6))
TOTAL				40 - 72 (48 - 80) (5)

(1) Os valores entre parêntesis correspondem ao número de amostras de água e de peixes a recolher caso se proceda a uma amostragem suplementar.

(2) O valor estimado de k_2 para log K_{OW} = 4,0 é de 0,652 $dias^{-1}$. A duração total do ensaio é dada por: 3 × t_{SS} = 3 × 4,6 dias, *ou seja,* 14 dias. Para o cálculo de t_{SS}, consultar o apêndice 5.

(3) Recolher as amostras de água após, pelo menos, três renovações do volume da célula.

(4) Estes peixes são recolhidos para amostra a partir da população de reserva.

(5) Caso sejam necessários estudos de metabolismo ou de precisão mais elevada que necessitem de um número mais elevado de peixes, estes devem ser recolhidos para amostra especificamente no final das fases de fixação e de depuração (*cf.* ponto 40).

(6) Podem ser necessários, pelo menos, 3 peixes adicionais para efeitos de análise do teor de lípidos, caso não seja possível utilizar os mesmos peixes recolhidos para determinação das concentrações da substância no início do ensaio, no final da fase de fixação e no final da fase de depuração. Importa salientar que, em muitos casos, deverá ser possível utilizar apenas três peixes do lote de controlo (*cf.* ponto 56).

▼M7

2. **Exemplo teórico de calendário de amostragem para um ensaio de bioacumulação por via alimentar da substância após uma fase de fixação de 10 dias e uma fase de depuração de 42 dias.**

Colheita de amostra	Calendário de amostragem		Número de amostras de alimento	Número de peixes por amostra	
	Dia da fase	Amostras adicionais de peixes?		Grupo de ensaio	Grupo de controlo
Fase de fixação					
1	0	Possível (1) (2)	3 — grupo de ensaio	0	5 — 10
			3 — grupo de controlo (1)		(8 — 13) (2)
1A (3)	1-3			5 - 10	5 - 10
2	10	Sim (4)	3 — grupo de ensaio	10 - 15 (4)	5 - 10
			3 — grupo de controlo (1)	(13 - 18) (5)	(8 - 13) (5)
Fase de depuração					
3	1	Sim (4)		10 - 15 (4)	5 - 10
4	2			5 - 10	5 - 10
5	4			5 - 10	5 - 10
6	7	Sim (4)		10 - 15 (4)	5 - 10
7	14			5 - 10	5 - 10
8	28			5 - 10	5 - 10
9	42	Sim (4)		10 - 15 (4) (13 - 18) (5)	5 - 10 (8 - 13) (5)
TOTAL				59 - 120 (63 - 126) (4) (5)	50 - 110 (56 - 116) (4) (5)

(1) Três amostras de alimento dos grupos de controlo e de ensaio analisadas para determinar as concentrações da substância em estudo e o teor de lípidos.

(2) Os peixes são recolhidos para amostra a partir da população de ensaio, o mais perto possível do início do estudo; devem ser recolhidos para amostra, pelo menos, três peixes da população de reserva no início do ensaio, para determinar o teor de lípidos.

(3) A recolha (facultativa) de amostras no início da fase de fixação fornece dados para calcular a assimilação alimentar da substância em estudo, que pode ser comparada com a eficiência de assimilação calculada a partir dos dados da fase de depuração.

(4) Podem recolher-se cinco peixes adicionais para efeitos de análise específica dos tecidos.

(5) Podem ser necessários, pelo menos, 3 peixes adicionais para efeitos de análise do teor de lípidos, caso não seja possível utilizar os mesmos peixes recolhidos para determinação das concentrações da substância no início do ensaio, no final da fase de fixação e no final da fase de depuração. Importa salientar que, em muitos casos, deve ser possível utilizar apenas três peixes do lote de controlo (*cf.* pontos 56 e 153).

Nota relativa à duração das fases e ao calendário de amostragem: A fase de fixação tem início com a primeira alimentação enriquecida. Um dia experimental tem início com uma alimentação e termina pouco antes da seguinte, 24 horas depois. A primeira colheita de amostra (1 no quadro) deve ocorrer pouco antes (por exemplo, uma hora) da primeira alimentação. Idealmente, a colheita de amostras durante um estudo deve ser efetuada pouco antes da alimentação do dia seguinte (*ou seja,* cerca de 23 horas após a alimentação do dia de recolha de amostras). A fase de fixação termina pouco antes da primeira alimentação com dieta não enriquecida, quando a fase de depuração tem início (é provável que os peixes do grupo de ensaio ainda se encontrem a digerir alimento enriquecido nas 24 horas seguintes à última alimentação com a dieta enriquecida). Assim, a amostra no final da fixação deve ser colhida pouco antes da primeira alimentação com a dieta não enriquecida e a primeira amostra da fase de depuração deve ser recolhida cerca de 23 horas após a primeira alimentação não enriquecida.

▼M7

Apêndice 5

CÁLCULOS GERAIS

1. Introdução

2. Estimativa da duração da fase de fixação

3. Estimativa da duração da fase de depuração

4. Método sequencial: determinação da constante de velocidade de *depuração*, *k2*

5. Método sequencial: determinação da *constante* de velocidade de fixação k1 (apenas no método de exposição por via aquosa)

6. Método simultâneo para o cálculo das constantes de velocidade de fixaç.ão e de depuração (apenas para o método de exposição POR VIA aquosa)

7. Correção em função da diluição de crescimento para o BMF e o BCF cinético

8. Normalização dos lípidos para um teor de lípidos de 5 % (apenas no método de exposição aquosa)

1. INTRODUÇÃO

É possível descrever o modelo geral de bioacumulação aquática nos peixes em termos de processos de fixação e de depuração, ignorando a fixação com alimentação. A equação diferencial (dC_f/dt) que descreve a taxa de variação na concentração nos peixes (mg·kg^{-1}·dia^{-1}) é a seguinte (1):

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 \times C_w - (k_2 + k_g + k_m + k_e) \times C_f \qquad \text{[Equação A5.1]}$$

Em que,

k_1 = Constante de velocidade de primeira ordem para a fixação nos peixes (l·kg^{-1}·dia^{-1}).

k_2 = Constante de velocidade de primeira ordem para a depuração dos peixes (dia^{-1}).

k_g = Constante de velocidade de primeira ordem para o crescimento dos peixes («diluição de crescimento») (dia^{-1})

k_m = Constante de velocidade de primeira ordem para a transformação metabólica (dia^{-1})

k_e = Constante de velocidade de primeira ordem para a egestão fecal (dia^{-1})

C_w = Concentração na água (mg·l^{-1}).

C_f = Concentração nos peixes (mg·kg^{-1} massa húmida).

No que se refere às substâncias bioacumuláveis, é previsível que uma média ponderada no tempo (TWA) constitua a concentração de exposição mais relevante em água (C_w) no intervalo de flutuação permitido (*cf.* ponto 24). Recomenda-se o cálculo de uma TWA da concentração na água em conformidade com o procedimento constante do apêndice 6 do método C.20 (2). Importa salientar que o logaritmo natural da concentração na água é adequado quando se prevê uma queda exponencial entre períodos de renovação, por exemplo, num ensaio de conceção semiestática. Num sistema dinâmico, pode não ser necessário o logaritmo natural das concentrações de exposição. Caso se obtenham os valores médios ponderados no tempo das concentrações em água, estes devem ser registados e utilizados nos cálculos subsequentes.

Num ensaio normal do BCF nos peixes, a fixação e a depuração podem ser descritas em termos de dois processos cinéticos de primeira ordem.

▼M7

Taxa de fixação = $k_1 \times C_w$ [Equação A5.2]

Taxa de perda global = $(k_2 + k_g + k_m + k_e) \times C_f$ [Equação A5.3]

No estado estacionário, pressupondo que o crescimento e o metabolismo são insignificantes (*ou seja,* não é possível distinguir os valores de k_g e k_m de zero), a velocidade de fixação é igual à velocidade de depuração, pelo que, combinando a equação A5.2 com a equação A5.3, se obtém o seguinte:

$$BCF = \frac{C_{f-SS}}{C_{w-SS}} = \frac{k_1}{k_2}$$ [Equação A5.4]

Em que

$C_{f\text{-}SS}$ = concentração nos peixes em estado estacionário (mg kg^{-1} massa húmida).

$C_{w\text{-}SS}$ = concentração na água no estado estacionário (mg l^{-1}).

O rácio k_1/k_2 é conhecido por BCF cinético (BCF_K) e deve ser igual ao BCF do estado estacionário (BCF_{SS}) obtido a partir do rácio entre a concentração nos peixes em estado estacionário e na água, mas podem verificar-se desvios caso o estado estacionário não for bem definido ou se tenham aplicado ao BCF cinético correções em função do crescimento. Todavia, uma vez que k_1 e k_2 são constantes, não é necessário atingir o estado estacionário para obter um BCF_K.

O presente apêndice inclui, com base nestas equações de primeira ordem, os cálculos gerais necessários para os métodos de bioacumulação da exposição aquosa e por via alimentar. Contudo, as secções 5, 6 e 8 são relevantes apenas para o método de exposição aquosa, sendo, todavia, incluídas neste apêndice porque constituem técnicas gerais. Os métodos sequencial (secções 4 e 5) e simultâneo (secção 6) permitem o cálculo das constantes de fixação e de depuração utilizadas para obter os BCF cinéticos. O método sequencial para determinar k_2 (secção 4) é importante no contexto do método por via alimentar, uma vez que é necessário ao cálculo tanto da eficiência de assimilação como do BMF. O apêndice 7 apresenta em pormenor os cálculos específicos do método por via alimentar.

2. ESTIMATIVA DA DURAÇÃO DA FASE DE FIXAÇÃO

Antes de realizar o ensaio, pode obter-se uma estimativa de k_2 e, consequentemente, do tempo necessário para atingir o estado estacionário, com base em relações empíricas entre k_2 e o coeficiente de partição *n*-octanol/água (K_{OW}) ou entre k_1 e o BCF. Contudo, é necessário ter consciência de que as equações apresentadas na presente secção são aplicáveis apenas quando a fixação e a depuração seguem uma cinética de primeira ordem. Caso seja evidente que tal não se verifica, recomenda-se que se solicite o parecer de um perito em bioestatística e/ou farmacocinética, caso se pretendam estimativas da fase de fixação.

É possível obter uma estimativa de k_2 (dia^{-1}) através de vários métodos. No primeiro caso, podem utilizar-se, por exemplo, as seguintes relações empíricas ([1]):

$\log k_2 = 1{,}47 - 0{,}414 \log K_{OW}$ (r^2=0,95) [(3); Equação A5.5]

ou

$$k_2 = \frac{k_1}{BCF}$$ [Equação A5.6]

Em que, $k_1 = 520 \times W^{-0,32}$ (para substâncias com $\log K_{OW} > 3$) (r^2=0,85)[(4); Equação A5.7]

([1]) Tal como qualquer relação empírica, deve verificar-se que a substância em estudo se insere no domínio de aplicabilidade da relação.

▼M7

E $BCF = 10^{(0{,}910 \cdot logK_{OW} - 1{,}975 \cdot log(6{,}8 \cdot 10^{-7} K_{OW} + 1) - 0{,}786)}$ (r^2=0,90)[(5); Equação A5.8]

W = peso médio dos peixes tratados (massa húmida em gramas) no final da fixação/início da depuração ([1])

Para outras relações conexas, ver (6). Pode ser vantajoso utilizar modelos mais complexos para obter a estimativa de k_2 caso, por exemplo, seja provável a ocorrência de metabolismo numa extensão significativa (7) (8). Porém, à medida que a complexidade do modelo aumenta, é necessária maior prudência na interpretação das estimativas. Por exemplo, a presença de grupos nitro pode indicar um metabolismo rápido, mas nem sempre é esse o caso. Portanto, na calendarização de um estudo, o utilizador deve ponderar os resultados do método de estimativa em função da estrutura química e de quaisquer outras informações relevantes (por exemplo, estudos preliminares).

Pode calcular-se o tempo necessário para atingir uma determinada percentagem do estado estacionário a partir do valor de k_2 estimado, com base na equação cinética que descreve a fixação e a depuração (assumindo uma cinética de primeira ordem), partindo do princípio de que o crescimento e o metabolismo são insignificantes. Caso ocorra um crescimento significativo durante o estudo, as estimativas descritas infra não serão fiáveis. Nestes casos, é melhor utilizar o valor k_{2g} corrigido em função do crescimento, como descrito adiante (secção 7 do presente apêndice):

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 C_W - k_2 C_f \qquad \text{[Equação A5.9]}$$

ou, para C_w constante:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_W (1 - e^{-k_2 t}) \qquad \text{[Equação A5.10]}$$

Na vizinhança do estado estacionário ($t \rightarrow \infty$), a equação A5.10 pode reduzir-se — *cf.* (9) (10) — a:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_W \qquad \text{[Equação A5.11]}$$

ou

$$\frac{C_f}{C_w} = \frac{k_1}{k_2} = BCF \qquad \text{[Equação A5.12]}$$

O valor BCF × C_w constitui uma aproximação da concentração nos peixes no estado estacionário ($C_{f\text{-}SS}$). [Nota: esta metodologia pode ser utilizada na estimativa do BMF do estado estacionário com o ensaio por via alimentar. Neste caso, o BCF é substituído pelo BMF e C_w por $C_{alimento}$ — concentração no alimento — nas equações supra]

A equação A5.10 pode transformar-se em:

$$C_f = C_{f\,-SS}(1 - e^{-k_2 t}) \qquad \text{[Equação A5.13]}$$

ou

$$\frac{C_f}{C_{f\,-SS}} = 1 - e^{-k_2 t} \qquad \text{[Equação A5.14]}$$

Aplicando a equação A5.14, pode prever-se o tempo necessário para atingir uma determinada percentagem do estado estacionário, utilizando o valor de k_2 determinado pela equação A5.5 ou pela equação A5.6.

Do ponto de vista estatístico, a duração ótima da fase de fixação para obter dados estatísticos fiáveis (BCF_K) consiste no período necessário para que a curva decorrente da representação gráfica do logaritmo da concentração da

([1]) O peso dos peixes no final da fase de fixação pode ser estimado a partir de dados de estudos anteriores ou de conhecimento prévio sobre o aumento provável da dimensão da espécie de ensaio a partir de um peso normal no início do ensaio ao longo de uma fase de fixação normal (por exemplo, 28 dias).

▼M7

substância em estudo nos peixes em função do tempo, numa escala aritmética, atinja pelo menos 50 % do estado estacionário (*ou seja*, 0,69/k_2, mas não mais de 95 % do estado estacionário (*ou seja,* 3,0/k_2) (11). O cálculo do BCF_{SS} torna-se possível se a bioacumulação atingir um valor superior a 95 % do estado estacionário.

Utilizando a equação A5.14, o tempo necessário para atingir 80 % do estado estacionário é dado por:

$$0{,}80 = 1 - e^{-k_2 t} \qquad \text{[Equação A5.15]}$$

ou

$$t_{80} = \frac{-\ln(0{,}20)}{k_2} = \frac{1{,}6}{k_2} \qquad \text{[Equação A5.16]}$$

De modo semelhante, o tempo necessário para atingir 95 % do estado estacionário é:

$$t_{95} = \frac{-\,ln\ (0{,}05)}{k_2} = \frac{3{,}0}{k_2} \qquad \text{[Equação A5.17]}$$

Por exemplo, para uma substância em estudo com log K_{OW} = 4, a duração da fase de fixação (*ou seja,* o tempo necessário para atingir uma determinada percentagem do estado estacionário, por exemplo, t_{80} ou t_{95}), utilizando a equação A5.5, a equação A5.16 e a equação A5.17, é:

$$log k_2 = 1{,}47 - 0{,}414 \cdot 4$$

$$k_2 = 0{,}652 \text{ dia}^{-1}$$

$$t_{80} = \frac{1{,}6}{0{,}652} = 2{,}45\ dias(59 horas)$$

$$\text{ou} t_{95} = \frac{3{,}0}{0{,}652} = 4{,}60\ dias(110 horas)$$

Como alternativa,

$$t_{eSS} = 6{,}54 \cdot 10^{-3} \cdot K_{OW} + 55{,}31\ (horass) \qquad \text{[Equação A5.18]}$$

$$t_{eSS} = 6{,}54 \cdot 10^{-3} \cdot 10^4 + 55{,}31 = 121\ horas$$

Para o cálculo do tempo necessário para atingir o estado estacionário real, t_{eSS} (12), pode utilizar-se a expressão infra. No caso de uma substância em estudo com log K_{OW} = 4, obtém-se:

3. ESTIMATIVA DA DURAÇÃO DA FASE DE DEPURAÇÃO

Com base na equação geral que descreve a fixação e a depuração, pressupondo uma cinética de primeira ordem, pode obter-se uma estimativa do tempo necessário para reduzir a carga corporal a uma determinada percentagem da concentração inicial (*cf.* equação A5.9 (1) (13)).

Para a fase de depuração, pressupõe-se que o valor C_w (ou $C_{alimento}$ para o ensaio por via alimentar) é zero. Assim, a equação pode ser reduzida a:

$$\frac{dC_f}{dt} = k_2 C_f \qquad \text{[Equação A5.19]}$$

ou

$$C_f = C_{f,0} \cdot e^{-k_2 t} \qquad \text{[Equação A5.20]}$$

em que $C_{f,0}$ representa a concentração no início do período de depuração.

O tempo necessário para atingir 50 % da depuração (t_{50}) é dado por:

▼M7

$$\frac{C_f}{C_{f,0}} = \frac{1}{2} = e^{-k_2 t_{50}}$$

ou

$$t_{50} = \frac{-\ln(0{,}50)}{k_2} = \frac{0{,}693}{k_2}$$

Do mesmo modo, o tempo necessário para atingir 95 % de depuração será:

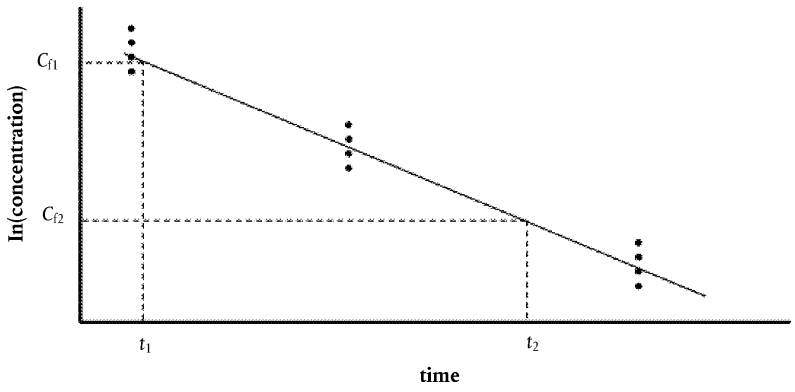
$$t_{95} = \frac{-\ln(0{,}05)}{k_2} = \frac{3{,}0}{k_2}$$

Caso se utilize um valor correspondente a 80 % da fixação no primeiro período ($1{,}6/k_2$) e a 95 % da depuração na fase respetiva ($3{,}0/k_2$), a duração da fase de depuração é aproximadamente o dobro da duração da fase de fixação.

Saliente-se que as estimativas em causa apenas são válidas para perfis de fixação e depuração que sigam uma cinética de primeira ordem. Caso seja evidente que tal não sucede, estas estimativas não são válidas.

4. MÉTODO SEQUENCIAL: DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE DE VELOCIDADE DE DEPURAÇÃO, K_2

Considera-se que a maioria dos dados referentes à bioconcentração são razoavelmente descritos por recurso a um modelo simples do tipo «dois compartimentos/dois parâmetros», baseado na linearidade da curva obtida das concentrações nos peixes (numa escala ln) durante a fase de depuração.



De sublinhar que os desvios a uma linha reta podem indicar um perfil de depuração mais complexo do que uma cinética de primeira ordem. Para abordar tipos de depuração que se desviem de uma cinética de primeira ordem, pode aplicar-se o método gráfico.

Para calcular o valor k_2 para vários pontos de amostragem, deve realizar-se uma regressão linear do logaritmo natural da concentração em função do tempo. O declive da linha obtida constitui uma estimativa da constante de velocidade de depuração k_2 ([1]). A partir da ordenada na origem, a concentração média nos peixes no início da fase de depuração ($C_{0,d}$; que é igual à concentração média nos peixes no final da fase de fixação) pode ser facilmente calculada (incluindo margens de erro) ([1]):

([1]) Na maioria dos programas de regressão linear, apresentam-se também os erros-padrão e o intervalo de confiança (IC) das estimativas (caso, por exemplo, do Microsoft Excel, recorrendo ao conjunto de ferramentas Data Analysis.

▼M7

$$C_{0,d} = e^{ord,origem} \qquad \text{[Equação A5.21]}$$

Para calcular o valor k_2 quando se encontram disponíveis apenas dois pontos (de amostragem) (como na conceção minimizada), as duas concentrações médias devem ser substituídas pela seguinte equação

$$k_2 = \frac{\ln (C_{fl}) - \ln (C_{f2})}{t_2 - t_1} \qquad \text{[Equação A5.22]}$$

Em que $\ln(C_{f1})$ e $\ln(C_{f2})$ são os logaritmos naturais das concentrações nos pontos t_1 e t_2, respetivamente, e t_2 e t_1 são os pontos em que as duas amostras foram recolhidas em relação ao início da depuração ([1]).

5. MÉTODO SEQUENCIAL: DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE DE VELOCIDADE DE FIXAÇÃO K_1 (APENAS NO MÉTODO DE EXPOSIÇÃO POR VIA AQUOSA)

Para determinar um valor de k_1 a partir de uma série sequencial de dados tempo/concentração para a fase de fixação, deve recorrer-se a um programa informático que utilize o seguinte modelo:

$$C_f(t) = C_w(t) \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (1 - e^{-k_2 t}) \qquad \text{[Equação A5.23]}$$

Em que k_2 é dado pelo cálculo anterior $C_f(t)$ e $C_w(t)$ são as concentrações nos peixes e na água, respetivamente, no ponto t.

Para calcular o valor de k_1 quando se dispõe apenas de dois pontos de amostragem (como na conceção minimizada), utiliza-se a seguinte fórmula:

$$k_1 = \frac{C_f \cdot k_2}{C_w(1 - e^{-k_2 t})} \qquad \text{[Equação A5.24]}$$

Em que k_2 é dado pelo cálculo anterior, C_f é a concentração nos peixes no início da fase de depuração e C_w é a concentração média na água durante a fase de fixação ([2]).

Pode proceder-se à inspeção visual dos declives k_1 e k_2 representados num gráfico em função dos dados relativos aos pontos de amostragem medidos para avaliar a adequação do ajustamento. Caso se verifique que o método sequencial não produziu uma boa estimativa do valor k_1, deve aplicar-se a metodologia simultânea para calcular os valores k_1 e k_2 (ver a secção 6 infra). Novamente, os declives resultantes devem ser comparados com a representação gráfica dos dados medidos para efeitos de inspeção visual da adequação do ajustamento. Caso o ajustamento ainda não seja adequado, isso pode indiciar que a cinética não é de primeira ordem e que se devem utilizar outros modelos mais complexos.

6. MÉTODO SIMULTÂNEO PARA O CÁLCULO DAS CONSTANTES DE VELOCIDADE DE FIXAÇ.ÃO E DE DEPURAÇÃO (APENAS PARA O MÉTODO DE EXPOSIÇÃO POR VIA AQUOSA)

Podem utilizar-se programas informáticos para obter valores para k_1 e k_2 a partir de uma série sequencial de dados tempo/concentração, aplicando o seguinte modelo teórico:

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (1 - e^{-k_2 t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[Equação A5.25]}$$

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (e^{-k_2 (t - t_c)} - e^{-k_2 t}) \qquad t > t_c \qquad \text{[Equação A5.26]}$$

em que

t_c = tempo decorrido até ao final da fase de fixação.

Esta metodologia fornece diretamente os erros-padrão das estimativas de k_1 e k_2. Se, nas equações A5.25 e A5.26, k_1/k_2 for substituído pelo BCF (*cf.* equação A5.4), é possível estimar igualmente o erro-padrão e o IC de

([1]) Ao contrário do que se verifica no método de regressão linear, o recurso a esta fórmula não permite obter um erro-padrão para k2.

([2]) Ao contrário do que se verifica num modelo de regressão linear, em regra, este método não produzirá um erro-padrão nem um intervalo de confiança para o valor k1 estimado.

▼M7

95 % do BCF. O que precede é de especial utilidade na comparação de diferentes estimativas devido à transformação dos dados. A variável dependente (concentração nos peixes) pode ser ajustada com ou sem o logaritmo natural e é possível avaliar a incerteza do BCF daí resultante.

Uma vez que existe uma forte correlação entre os dois parâmetros k_1 e k_2, se os mesmos forem estimados simultaneamente pode ser recomendável calcular em primeiro lugar o valor k_2 apenas a partir dos dados de depuração (ver supra); este valor pode, na maioria dos casos, ser estimado a partir da curva de depuração com uma precisão relativamente elevada. O valor k_1 pode ser subsequentemente calculado a partir dos dados de fixação, por regressão não linear ([1]). Recomenda-se o recurso à mesma transformação dos dados no ajustamento sequencial.

Pode proceder-se à inspeção visual dos declives resultantes se representados num gráfico em função dos dados relativos aos pontos de amostragem medidos para avaliar a adequação do ajustamento. Caso se verifique que este método não produziu uma boa estimativa do valor k_1, pode aplicar-se a metodologia simultânea para calcular os valores k_1 e k_2. Também aqui, o modelo ajustado deve ser comparado com a representação gráfica dos dados medidos com vista à inspeção visual da adequação do ajustamento e das estimativas de parâmetros resultantes para k_1, k_2; o BCF resultante e os respetivos erros-padrão e/ou intervalos de confiança devem ser comparados entre os diferentes tipos de ajustamento.

Caso a adequação do ajustamento seja fraca, pode indiciar que não é aplicável uma cinética de primeira ordem e de que se devem utilizar outros modelos mais complexos. Uma das complicações mais comuns é o crescimento dos peixes durante o ensaio.

7. CORREÇÃO EM FUNÇÃO DA DILUIÇÃO DE CRESCIMENTO PARA O BMF E O BCF CINÉTICO

A presente secção descreve um método normalizado (denominado «diluição de crescimento») para a correção devido ao crescimento dos peixes durante o ensaio, que é valido apenas se a cinética for de primeira ordem. Caso existam indícios de que tal não sucede, recomenda-se que se solicite o parecer de um perito em bioestatística para uma correção adequada em função da diluição de crescimento, ou que se utilize a metodologia baseada na massa descrita infra.

Por vezes, o método de correção em função da diluição de crescimento carece de precisão, podendo mesmo não ser adequado (por exemplo, no caso de substâncias de depuração muito lenta ensaiadas em peixes de crescimento rápido, a constante de velocidade de depuração obtida corrigida em função da diluição de crescimento, k_{2g}, pode ser muito reduzida, pelo que o erro nas duas constantes de velocidade utilizadas para a obter se torna crítico; por vezes, as estimativas do valor k_g podem ser superiores a k_2). Nestes casos, é possível utilizar uma metodologia alternativa (metodologia baseada na massa), que também funciona quando a cinética não é de primeira ordem, o que evita a necessidade de correção. Esta metodologia é descrita no final da presente secção.

Método de subtração da constante de velocidade de crescimento para efeitos de correção em função do crescimento

No caso do método normalizado, todos os dados relativos ao peso e comprimento individual são convertidos em logaritmos naturais e ln(peso) ou ln(1/peso) é representado graficamente em função do tempo (dia), separadamente para os grupos de tratamento e de controlo. Aplica-se o mesmo processo, separadamente, aos dados das fases de fixação e de depuração. Em regra, para fins de correção em função da diluição de crescimento, é mais adequado utilizar os dados relativos ao peso de todo o estudo para obter a

([1]) É necessário estar consciente de que a incerteza na estimativa de k2 não é utilizada de modo adequado no modelo de bioacumulação de for essencialmente considerada uma constante no ajustamento de k1 no método de ajustamento sequencial. Portanto, a incerteza resultante relativa ao BCF será diferente entre os métodos de ajustamento simultâneo e sequencial.

▼M7

constante de velocidade de crescimento (k_g), mas a ocorrência de diferenças estatisticamente significativas entre as constantes de velocidade de crescimento obtidas para a fase de fixação e de depuração pode indicar a necessidade de utilizar a constante de velocidade da fase de depuração. É possível utilizar as taxas de crescimento global dos estudos aquosos para os grupos de ensaio e de controlo para determinar a ocorrência de efeitos relacionados com o tratamento.

Aplica-se uma correlação linear dos mínimos quadrados ao logaritmo natural do peso dos peixes em função do dia (e para ln(1/peso) em função do dia), para cada grupo (grupos de controlo e de ensaio(s), dados individuais e não valores médios diários) e para o estudo na sua globalidade, isto é, as fases de fixação e de depuração, por métodos estatísticos normalizados. Calculam-se as variâncias nos declives das linhas, que são utilizadas para avaliar a significância estatística (p = 0,05) da diferença nos declives (constantes de velocidade de crescimento), através do teste t de Student (ou por análise ANOVA, caso se proceda ao ensaio de mais do que uma concentração). Em geral, os dados relativos ao peso são preferíveis para fins de correção em função do crescimento. Os dados relativos ao comprimento, tratados da mesma forma, podem ser úteis para comparar os grupos de controlo e de ensaio no que se refere a efeitos relacionados com o tratamento. Caso não se observe uma diferença estatisticamente significativa na análise dos dados relativos ao peso, os dados de ensaio e de controlo podem ser combinados e pode calcular-se uma constante de velocidade de crescimento global dos peixes para o estudo (k_g), que é o declive global da correlação linear. Caso se observem diferenças estatisticamente significativas, as constantes de velocidade de crescimento são registadas separadamente para cada grupo de peixes e/ou cada fase do estudo. A constante de velocidade de cada grupo tratado deve ser utilizada para efeitos de correção em função da diluição de crescimento desse grupo. Se se observarem diferenças estatísticas entre as constantes de velocidade das fases de fixação e de depuração, devem utilizar-se as constantes de velocidade obtidas na fase de depuração.

Para obter a constante de velocidade de depuração, k_{2g}, pode subtrair-se a constante de velocidade de crescimento calculada (k_g, expressa em dia^{-1}) à constante de velocidade de depuração global (k_2).

$$k_{2g} = k_2 - k_g \qquad \text{[Equação A5.27]}$$

A constante de velocidade de fixação é dividida pela constante de velocidade de depuração corrigida em função do crescimento para obter o BCF cinético corrigido em função do crescimento, denominado BCF_{Kg} (ou BMF_{Kg}).

$$BCF_{Kg} = \frac{k_1}{k_{2g}} \qquad \text{[Equação A5.28]}$$

A constante de velocidade de crescimento obtida para um estudo por via alimentar é utilizada na equação A7.5 para calcular o BMF_{Kg} corrigido em função do crescimento (*cf.* apêndice 7).

Método de correção em função do crescimento com base na massa

Descreve-se de seguida, uma alternativa ao método de subtração da constante de velocidade de crescimento supra que evita a necessidade da correção em função do crescimento. O princípio consiste em utilizar dados de depuração com base na massa, por peixe inteiro, em vez dados baseados na concentração.

As concentrações nos tecidos na fase de depuração (massa da substância em estudo/unidade de massa dos peixes) devem ser convertidas na massa da substância em estudo/peixes: devem fazer-se corresponder, num quadro, as concentrações e o peso individual dos peixes (por exemplo, recorrendo a uma folha de cálculo informática) e multiplicar cada concentração pelo peso total dos peixes, para que essa medição dê origem a um conjunto de massa da substância em estudo/peixes para todas as amostras da fase de depuração.

De seguida, representa-se graficamente o logaritmo natural resultante dos dados relativos à massa da substância em função do tempo, para a fase de depuração da experiência tal como seria normalmente realizada.

▼M7

No que respeita ao método de exposição por via aquosa, deve obter-se normalmente a constante de velocidade de fixação (ver secções 4 e 6; importa salientar que se deve utilizar o valor k_2 «normal» nas equações de ajustamento das curvas para k_1) e a constante de velocidade de depuração a partir dos dados supra. Uma vez que — por ter sido obtido com base na massa por peixe inteiro — o valor resultante para a constante de velocidade de depuração é independente do crescimento, deve denominar-se k_{2g} e não k_2.

8. NORMALIZAÇÃO DOS LÍPIDOS PARA UM TEOR DE LÍPIDOS DE 5 % (APENAS NO MÉTODO DE EXPOSIÇÃO AQUOSA)

Os resultados do BCF (cinético e em estado estacionário) dos ensaios de exposição aquosa também devem ser registados em relação a um teor normalizado de lípidos de 5 % da massa húmida, por peixe, a menos que seja possível argumentar que a substância em estudo não se acumula principalmente nos lípidos (por exemplo, algumas substâncias perfluoradas podem ligar-se às proteínas). É necessário converter os dados relativos à concentração nos peixes, ou o BCF, num um teor de lípidos de 5 % em relação à massa húmida. Caso se utilizem os mesmos peixes para medir as concentrações da substância e o teor de lípidos em todos os pontos de amostragem, é necessário corrigir todas as concentrações individuais medidas em função do teor de lípidos desse peixe.

$$C_{f,L} = \frac{0{,}05}{L} \cdot C_f \qquad \text{[Equação A5.29]}$$

em que

$C_{f,L}$ = concentração nos peixes normalizada em função dos lípidos (mg kg^{-1} massa húmida)

L = fração de lípidos (com base na massa húmida)

C_f = concentração da substância em estudo nos peixes (mg kg^{-1} massa húmida)

Se não se tiver procedido à análise dos lípidos em todos os peixes recolhidos para amostra, deve utilizar-se um valor médio para normalizar o BCF. Para o BCF do estado estacionário, deve utilizar-se o valor médio registado no final da fase de fixação no grupo de tratamento. Para a normalização de um BCF cinético, pode justificar-se, por vezes, uma metodologia diferente, por exemplo, caso se tenham verificado alterações significativas do teor de lípidos durante a fase de fixação ou de depuração. De qualquer modo, deve utilizar-se normalmente uma taxa de alimentação que minimize alterações significativas do teor de lípidos.

$$BCF_{KL} = \frac{0.05}{L_n} \cdot BCF_K \qquad \text{[Equação A5.30]}$$

em que

BCF_{KL} = BCF cinético normalizado em função dos lípidos (L kg^{-1})

L_n = fração média de lípidos (com base na massa húmida)

BCF_K = BCF cinético (L kg^{-1})

REFERÊNCIAS

1) Arnot J.A. e Gobas F.A.P.C. (2004), A food web bioaccumulation model for organic chemicals in aquatic ecosystems, Environ. Toxicol. Chem. 23: 2343--2355.

2) Capítulo C.20 do presente anexo: *Ensaio sobre a reprodução da Daphnia magna*.

3) Spacie A. and Hamelink J.L. (1982), Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. Environ. Toxicol. Chem. 1: 309-320.

▼**M7**

4) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. and Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined *in vivo* and in isolated perfused gills. Toxicol. Appl. Pharmacol. 131: 130-135.

5) Bintein S., Devillers J. and Karcher W. (1993), Nonlinear dependence of fish bioconcentration on *n*-octanol/water partition coefficient. SAR QSAR Environ. Res. 1: 29-39.

6) Kristensen P. (1991), Bioconcentration in fish: comparison of BCF's derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Danish Water Quality Institute, Hørsholm, Denmark.

7) Arnot J.A., Meylan W., Tunkel J., Howard P.H., Mackay D., Bonnell M. and Boethling R.S. (2009), A quantitative structure-activity relationship for predicting metabolic biotransformation rates for organic chemicals in fish. Environ. Toxicol. Chem. 28: 1168-1177.

8) OCDE (2011), QSAR Toolbox 2.1. February 2011. Available from: http://www.oecd.org/document/54/0,3746,en_2649_34379_42923638_1_1_1_1,00.html.

9) Branson D.R., Blau G.E., Alexander H.C. and Neely W.B. (1975). Bioconcentration of 2,2′,4,4′ tetrachlorobiphenyl in rainbow trout as measured by an accelerated test. T. Am. Fish. Soc. 104: 785-792.

10) Ernst W. (1985), Accumulation in aquatic organisms, in Appraisal of tests to predict the environmental behaviour of chemicals, Sheeman, P., *et al*., Editors. John Wiley & Sons Ltd, New York, NY, USA: 243-255.

11) Reilly P.M., Bajramovic R., Blau G.E., Branson D.R. and Sauerhoff M.W. (1977), Guidelines for the optimal design of experiments to estimate parameters in first order kinetic models. Can. J. Chem. Eng. 55: 614-622.

12) Hawker D.W. and Connell D.W. (1988), Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Res. 22: 701-707.

13) Konemann H. and van Leeuwen K. (1980), Toxicokinetics in fish: Accumulation and elimination of six chlorobenzenes by guppies. Chemosphere. 9: 3-19.

▼M7

Apêndice 6

SECÇÃO DE EQUAÇÕES PARA O ENSAIO DE EXPOSIÇÃO AQUOSA: ENSAIO DE CONCEÇÃO MINIMIZADA

A fundamentação subjacente a esta metodologia é que o fator de bioconcentração num ensaio completo pode ser determinado como fator de bioconcentração do estado estacionário (BCF_{SS}), através do cálculo do rácio entre a concentração da substância em estudo nos tecidos dos peixes e a concentração da substância em estudo na água, ou mediante o cálculo do fator de bioconcentração cinético (BCF_K) como rácio entre a constante de velocidade de fixação k_1 e a constante de velocidade de depuração k_2. O BCF_K é válido mesmo que não se alcance a concentração da substância no estado estacionário durante a fixação, desde que esta última e a depuração sigam aproximadamente processos de cinética de primeira ordem.

Caso se efetue uma medição da concentração da substância nos tecidos (C_{f1}) no momento em que a exposição termina (t_1) e a concentração nos tecidos (C_{f2}) for novamente medida após algum tempo (t_2), é possível estimar a constante de velocidade de depuração (k_2) por recurso à equação A5.22 do apêndice 5.

A constante de velocidade de fixação, k_1, pode ser então determinada algebricamente através da equação A5.23 do apêndice 5 (em que C_f é igual a C_{f1} e t é igual a t_1) (1). O fator de bioconcentração cinético para a conceção minimizada (denominado BCF_{Km} para o distinguir dos fatores de bioconcentração cinéticos determinados através de outros métodos) é o seguinte:

$$BCF_{Km} = \frac{k_1}{k_2} \qquad \text{[Equação A6.1]}$$

As concentrações ou os resultados devem ser corrigidos em função da diluição de crescimento e normalizados em função de um teor de lípidos dos peixes de 5 %, como descrito no apêndice 5.

O BCF_{SS} minimizado é o BCF calculado no final da fase de fixação, pressupondo que se atingiu o estado estacionário. Apenas se pode pressupor o que precede porque o número de pontos de amostragem não é suficiente para o provar.

$$\text{BCF}_{\text{SS}}\text{minimizado} = \frac{C_{f-minSS}}{C_{w-minSS}} \qquad \text{[Equação A6.2]}$$

Em que

$C_{f\text{-}minSS}$ = Concentração nos peixes no estado estacionário pressuposto no final da fase de fixação (mg kg^{-1} massa húmida).

$C_{w\text{-}minSS}$ = Concentração na água no estado estacionário pressuposto no final da fase de fixação (mg kg^{-1}).

REFERÊNCIAS

1) Springer T.A., Guiney P.D., Krueger H.O. e Jaber M.J. (2008), Assessment of an approach to estimating aquatic bioconcentration factors using reduced sampling. Environ. Toxicol. Chem. 27: 2271-2280.

▼M7

Apêndice 7

SECÇÃO DE EQUAÇÕES PARA O ENSAIO DE EXPOSIÇÃO POR VIA ALIMENTAR

1. Exemplo de quantidades de constituintes de um alimento comercial para peixes

2. Exemplos de técnicas de enriquecimento do alimento

3. Cálculo da eficiência de assimilação e do fator de bioamplificação

4. Correção em função dos lípidos

5. Avaliação das diferenças entre a concentração medida no instante zero (C0,m) e a *concentração* obtida no instante zero (*C0,d*)

6. Orientações para substâncias em estudo com depuração muito rápida

1. EXEMPLO DE QUANTIDADES DE CONSTITUINTES DE UM ALIMENTO COMERCIAL PARA PEIXES

Principal constituinte	farinha de peixe
Proteína bruta	≤ 55,0 %
Matéria gorda bruta	≤ 15,0 % [1]
Fibra bruta	≥ 2,0 %
Humidade	≥ 12 %
Cinzas	≥ 8 %

[1] Em algumas regiões, pode ser possível obter apenas alimento para peixe com uma concentração de lípidos muito inferior a este limite superior. Nesses casos, os estudos devem ser executados com a concentração de lípidos inferior nos alimentos conforme fornecidos e a taxa de alimentação ajustada em conformidade para manter a saúde dos peixes. Não se deve aumentar os lípidos nos alimentos de forma artificial através da adição de óleo em excesso.

2. EXEMPLOS DE TÉCNICAS DE ENRIQUECIMENTO DO ALIMENTO

Generalidades

As dietas de controlo devem ser preparadas exatamente da mesma forma que a dieta enriquecida, mas com a ausência da substância em estudo.

Para verificar a concentração da dieta tratada, devem recolher-se, por um método adequado, amostras em triplicado do alimento enriquecido e determinar-se a concentração da substância em estudo ou a radioatividade nos extratos. Deve demonstrar-se a ocorrência de recuperações analíticas elevadas (> 85 %) com variação reduzida entre amostras (as três concentrações das amostras da substância recolhidas no início do ensaio não devem variar mais de ± 15 % da média).

Durante o ensaio por via alimentar, devem recolher-se três amostras da dieta para análise no dia 0 e no final da fase de fixação, para determinar o teor da substância em estudo na dieta.

Preparação do alimento para peixes com um material de ensaio líquido (puro)

Deve definir-se uma concentração de ensaio nominal pretendida no alimento para peixes tratado, por exemplo, 500 μg de substância em estudo/g alimento. Num frasco de vidro ou numa ampola de um evaporador rotativo, adiciona-se a quantidade adequada (em termos de massa molar ou radioatividade específica) da substância em ensaio pura a uma massa conhecida de alimento para peixes. A massa de alimento para peixes deve ser suficiente para a duração da fase de fixação (atendendo à necessidade de utilizar quantidades crescentes em

▼M7

cada administração de alimentos, devido ao crescimento dos peixes). O alimento para peixes/a substância em estudo devem ser misturados de um dia para o outro por rotação lenta em tambor (p. ex., com um rotor giratório ou por rotação — caso se utilize a ampola de um evaporador rotativo). A alimentação enriquecida deve ser armazenada em condições (por exemplo, de refrigeração) que mantenham a estabilidade da substância em estudo até à utilização dos alimentos.

Preparação do alimento para peixes com um excipiente de óleo de peixe ou de milho

As substâncias em estudo sólidas devem ser moídas num almofariz até que se obtenha um pó fino. As substâncias em estudo líquidas podem ser diretamente adicionadas ao óleo de peixe ou de milho. A substância em estudo deve ser dissolvida numa quantidade conhecida de óleo de peixe ou de milho (por exemplo, 5-15 ml). O óleo com a substância é transferido quantitativamente para uma ampola de um evaporador rotativo de dimensão adequada. O frasco utilizado para preparar o óleo com a substância deve ser lavado com duas pequenas alíquotas de óleo que serão acrescentadas à ampola para garantir a transferência de toda a substância em estudo. Para garantir a dissolução/dispersão completa no óleo (ou caso se utilize mais do que uma substância em estudo no ensaio), introduz-se um microagitador, o frasco é tapado e a mistura é vigorosamente agitada de um dia para o outro. Para o ensaio, coloca-se uma quantidade adequada de alimento dos peixes (normalmente sob a forma de granulados) na ampola, sendo o conteúdo desta agitado de modo homogéneo por rotação contínua durante, pelo menos, 30 minutos, mas de preferência de um dia para o outro. A partir daí, o alimento enriquecido é armazenado de modo adequado (p.ex., com refrigeração) para garantir a estabilidade da substância em estudo no alimento até à utilização deste.

Preparação do alimento para peixes com um solvente orgânico

Dissolve-se uma quantidade adequada (em termos de massa molar ou radioatividade específica) da substância em estudo, suficiente para atingir a dose pretendida, num solvente orgânico adequado (p. ex., 10-40 ml de ciclo-hexano ou acetona, ou um volume mais elevado se necessário, em função da quantidade de alimentos a enriquecer). Deve misturar-se quer uma alíquota desta solução quer a totalidade da mesma (no que se refere à porção adicionada) com a massa de alimento para peixes adequada suficiente para que o ensaio atinja o nível de dosagem nominal exigido. O alimento/a substância em estudo podem ser misturados num recipiente de mistura de aço inoxidável; o alimento recentemente enriquecido deve permanecer no recipiente, numa hote, durante dois dias, sendo ocasionalmente agitado, para permitir que o excesso de solvente evapore, ou colocado na ampola de um evaporador rotativo com rotação contínua. O excesso de solvente pode ser removido com um fluxo de ar ou azoto, se necessário. Há que garantir que a substância em estudo não cristaliza à medida que o solvente é removido. A alimentação enriquecida deve ser armazenada em condições (p. ex., com refrigeração) que mantenham a estabilidade da substância em estudo até à utilização dos alimentos.

3. CÁLCULO DA EFICIÊNCIA DE ASSIMILAÇÃO E DO FATOR DE BIOAMPLIFICAÇÃO

Para calcular a eficiência de assimilação, deve estimar-se, em primeiro lugar, a constante de velocidade de depuração de acordo com a secção 4 do apêndice 5 (através do «método sequencial», *ou seja,* regressão linear normalizada) com concentrações médias das amostras da fase de depuração. A constante de velocidade de alimentação, I, e a duração da fixação, t, são parâmetros conhecidos do estudo. O parâmetro C_{alimento} — concentração média da substância em estudo no alimento — é uma variável determinada no ensaio. $C_{0,\text{d}}$, a concentração da substância em estudo nos peixes no final da fase de fixação, é normalmente obtida a partir da ordenada na origem de uma representação gráfica do logaritmo natural da concentração em função do dia de depuração.

A eficiência de assimilação da substância (a, absorção da substância em estudo no intestino) é calculada do seguinte modo:

$$\alpha = \frac{C_{0,d} \cdot k_2}{I \cdot C_{alimento}} \cdot \frac{1}{1 - e^{-k_2 t}} \qquad \text{[Equação A7.1]}$$

em que:

$C_{0,d}$ = concentração obtida nos peixes no instante zero da fase de depuração (mg kg^{-1});

▼M7

k_2 = constante de velocidade de depuração global (não corrigida em função do crescimento) (dia^{-1}), calculada segundo as equações apresentadas no apêndice 5, secção 3;

I = constante de velocidade de ingestão do alimento (g alimento g^{-1} peixes dia^{-1});

C_{alimento} = concentração nos alimentos (mg kg^{-1} alimento);

t = duração do período de alimentação (dia)

Pode ser, contudo, necessário ajustar a taxa de alimentação, I, utilizada no cálculo em função do crescimento dos peixes, para obter uma eficiência de assimilação correta, a. Num ensaio em que os peixes cresçam significativamente durante a fase de fixação (na qual não é efetuada qualquer correção das quantidades de alimentação para manter a taxa de alimentação definida), a taxa de alimentação real à medida que a fixação progride será inferior à definida, o que resulta numa eficiência de assimilação «real» mais elevada. Importa salientar que o que precede não é importante para o cálculo global do BMF, já que as condições de I são efetivamente anuladas entre a equação A7.1 e a equação A7.4. É possível obter a taxa média de alimentação corrigida em função da diluição de crescimento, I_g, de várias formas, mas um método simples e rigoroso consiste na utilização da constante de velocidade de crescimento conhecida (k_g) para estimar o peso dos peixes de ensaio em determinados pontos durante a fase de fixação, *ou seja*:

$$W_f(t) = W_{f,0} \times e^{k_g \cdot t} \qquad \text{[Equação A7.2]}$$

em que

$W_f(t)$ = peso médio dos peixes no dia de fixação t

$W_{f,0}$ = peso médio dos peixes no início da experiência

Deste modo, é (pelo menos) possível estimar o peso médio dos peixes no último dia de exposição ($W_{\text{f,final da fixação}}$). Uma vez que a taxa de alimentação foi definida com base em $W_{f,0}$, é possível calcular a taxa de alimentação real para cada dia de fixação através destes dois valores relativos ao peso. A taxa de alimentação corrigida em função do crescimento, I_g (g alimento g^{-1} peixes dia^{-1}), a utilizar em vez de I em casos de crescimento rápido durante a fase de fixação, pode ser calculada como

$$I_g = \frac{I \times W_{f,0}}{W_{\textit{final da absorção}}} \qquad \text{[Equação A7.3]}$$

Após a obtenção da eficiência de alimentação, é possível calcular o BMF multiplicando-a pela constante de velocidade de alimentação I (ou I_g, se utilizado para calcular α) e dividindo o produto pela constante de velocidade de depuração global k_2:

$$BMF = \frac{I \times \alpha}{k_2} \qquad \text{[Equação A7.4]}$$

O fator de bioamplificação corrigido em função do crescimento deve ser calculado da mesma forma, com a constante de velocidade de depuração corrigida em função do crescimento (obtida em conformidade com a secção 7 do apêndice 5). Novamente, se I_g tiver sido utilizado para calcular α, também deve ser utilizado neste caso em vez de I:

$$BMF = \frac{I \times \alpha}{k_{2g}} \qquad \text{[Equação A7.5]}$$

em que:

α = eficiência de assimilação (absorção da substância em estudo no intestino);

k_2 = constante de velocidade de depuração global (não corrigida em função do crescimento) (dia^{-1}), calculada segundo as equações apresentadas no apêndice 5, secção 3;

▼M7

k_{2g} = constante de velocidade de depuração corrigida em função do crescimento (dia^{-1});

I = constante de velocidade de ingestão do alimento (g alimento g^{-1} peixes dia^{-1});

A semivida corrigida em função do crescimento ($t_{1/2}$) é calculada da seguinte forma.

$$t_{1/2} = \frac{0{,}693}{k_{2g}} \qquad \text{[Equação A7.6]}$$

A eficiência de assimilação da substância a partir da alimentação também pode ser estimada se se determinarem os resíduos nos tecidos durante a fase linear da fase de fixação (entre os dias 1 e 3). Neste caso, é possível determinar a eficiência de assimilação da substância (α) do seguinte modo

$$\alpha = \frac{C_{peixes}(t)}{I \times C_{alimento} \times t} \qquad \text{[Equação A7.7]}$$

Em que,

C_{peixes} *(t)* = a concentração da substância em estudo nos peixes no tempo t (mg kg^{-1} massa húmida).

4. CORREÇÃO EM FUNÇÃO DOS LÍPIDOS

Caso se tenha determinado o teor de lípidos nos mesmos peixes que foram submetidos a análise para a determinação da substância em todos os intervalos de amostragem, as concentrações individuais devem ser corrigidas em função dos lípidos e o logaritmo natural da concentração corrigido em função dos lípidos deve ser representado graficamente em função da depuração (dia) para apresentar $C_{0,d}$ e k_2. Subsequentemente, é possível calcular a eficiência de assimilação (equação A7.1) em função dos lípidos, através de C_{alimento} em função dos lípidos (*isto é,* C_{alimento} é multiplicado pela fração média de lípidos do alimento). O cálculo subsequente com a equação A7.4 e a equação A7.5 dará diretamente o BMF corrigido em função dos lípidos (e corrigido em função da diluição de crescimento).

Caso contrário, a fração média de lípidos (p/p) nos peixes e nos alimentos é obtida para os grupos de tratamento e de controlo (para os alimentos e os peixes do grupo de controlo isto é normalmente efetuado a partir dos dados determinados no início e no final da exposição; no que se refere aos peixes do grupo de tratamento, isto é normalmente realizado a partir dos dados determinados apenas no final da exposição). Em alguns estudos, o teor de lípidos dos peixes pode aumentar significativamente; nesses casos, é mais adequado utilizar uma concentração média de lípidos nos peixes do lote de ensaio calculada a partir dos valores medidos no final da exposição e no final da depuração. Em geral, devem utilizar-se apenas os dados do grupo de tratamento para obter ambas as frações de lípidos.

O fator de correção em função dos lípidos ($L_{,c}$) é calculado da seguinte forma:

$$L_C = \frac{L_{peixes}}{L_{alimento}} \qquad \text{[Equação A7.8]}$$

Em que L_{peixes} e L_{alimento} são as frações médias de lípidos nos peixes e no alimento, respetivamente.

O fator de correção em função dos lípidos é utilizado para calcular o fator de bioamplificação corrigido em função dos lípidos (BMF_L):

$$BMF_L = \frac{BMF}{L_C} \qquad \text{[Equação A7.9]}$$

5. AVALIAÇÃO DAS DIFERENÇAS ENTRE A CONCENTRAÇÃO MEDIDA NO INSTANTE ZERO ($C_{0,M}$) E A CONCENTRAÇÃO OBTIDA NO INSTANTE ZERO ($C_{0,D}$)

A concentração medida no instante zero ($C_{0,m}$) e a concentração obtida no instante zero ($C_{0,d}$) devem ser comparadas. Caso sejam muito semelhantes, tal apoia o modelo de primeira ordem utilizado para obter os parâmetros de depuração.

▼M7

Em alguns estudos, pode observar-se uma diferença acentuada entre o valor obtido no instante zero $C_{0,d}$, e a concentração média medida no instante zero, $C_{0,m}$ (ver último ponto do ponto 159 do presente método de ensaio). Se $C_{0,d}$ for muito inferior a $C_{0,m}$ ($C_{0,d} << C_{0,m}$), a diferença pode sugerir a presença de alimento enriquecido não digerido nos intestinos. Isto pode ser verificado experimentalmente mediante uma análise separada do intestino excisado, caso tenham sido recolhidas e armazenadas no final da fase de fixação amostras adicionais (peixes inteiros). Caso contrário, se um teste estatisticamente válido aos valores anómalos aplicado à regressão linear da fase de depuração indicar que o primeiro ponto de amostragem da depuração é erradamente elevado, pode ser adequado executar a regressão linear para obter k_2 omitindo o primeiro ponto de concentração da depuração. Nestes casos, se a incerteza na regressão linear diminuir de forma acentuada, e for evidente que se registou uma cinética aproximadamente de primeira ordem, pode ser adequado utilizar os valores $C_{0,d}$ e k_2 resultantes no cálculo da eficiência de assimilação. O que precede deve ser devidamente fundamentado no relatório. É igualmente possível que não se seguisse uma cinética de primeira ordem na fase de depuração. Caso isto seja provável (*ou seja,* o logaritmo natural dos dados parece seguir uma curva em comparação com a representação gráfica da regressão linear em linha reta), é pouco provável que os cálculos de k_2 e $C_{0,d}$ sejam válidos e deve solicitar-se a orientação de um perito em bioestatística.

Se $C_{0,d}$ for muito superior ao valor medido ($C_{0,d} >> C_{0,m}$), isto pode indicar o seguinte: que a substância foi depurada com grande rapidez (*ou seja,* os pontos de amostragem aproximaram-se do limite de quantificação do método analítico muito cedo na fase de depuração, *cf.* secção 6 infra); que se verificou um desvio da cinética de primeira ordem; que a regressão linear para obter k_2 e $C_{0,d}$ está errada; ou que ocorreu um problema com as concentrações medidas no estudo em alguns pontos de amostragem. Nesses casos, deve analisar-se a representação gráfica da regressão linear para verificar a ocorrência de amostras no limite de quantificação ou perto deste, valores anómalos e uma curvatura óbvia (que sugere que não se seguiu uma cinética de primeira ordem), e esses aspetos salientados no relatório. Qualquer reavaliação subsequente da regressão linear para melhorar os valores estimados deve ser descrita e fundamentada. Caso se observe um desvio acentuado da cinética de primeira ordem, é pouco provável que os cálculos de k_2 e $C_{0,d}$ sejam válidos e deve solicitar-se a orientação de um perito em bioestatística.

6. ORIENTAÇÕES PARA SUBSTÂNCIAS EM ESTUDO COM DEPURAÇÃO MUITO RÁPIDA

Tal como discutido no ponto 129 do método de ensaio, algumas substâncias pode depurar com uma rapidez tal que não é possível obter uma concentração fiável no instante zero, $C_{0,d}$, e k_2 porque num momento muito precoce da fase de depuração (*isto é,* a partir da segunda amostra de depuração) deixa de ser possível medir efetivamente a substância nas amostras (concentrações registadas no limite de quantificação). Esta situação foi observada no ensaio interlaboratorial levado a cabo para fundamentar este método de ensaio com benzo[a]pireno e documentada no relatório de validação do método. Nestes casos não é possível realizar uma regressão linear com fiabilidade, sendo que esta é suscetível de dar uma estimativa elevada pouco realista de $C_{0,d}$, o que resulta numa eficiência de assimilação aparente muito superior a 1. Nestes casos, é possível calcular uma estimativa prudente de k_2 e um «limite superior» do BMF.

Utilizando os valores da fase de depuração nos quais se mediu uma concentração, até e incluindo a primeira concentração «não detetável» (concentração no limite de quantificação), uma regressão linear (utilizando o logaritmo natural da concentração em função do tempo) dará uma estimativa de k_2. Para estes tipos de casos, é provável que tal implique apenas dois valores (por exemplo, dias 1 e 2 de depuração) e subsequentemente é possível estimar o valor k_2 através da equação A5.22 no apêndice 5. Esta estimativa de k_2 pode ser utilizada para estimar uma eficiência de assimilação de acordo com a equação A7.1, substituindo o valor $C_{0,d}$ na equação pela concentração

▼**M7**

medida no instante zero ($C_{0,m}$) nos casos em que se estime claramente que $C_{0,d}$ é muito superior ao que teria sido possível atingir no ensaio. Caso $C_{0,m}$ não seja determinável, deve utilizar-se o limite de deteção nos tecidos dos peixes. Se, em alguns casos, se obtiver um valor de $\alpha > 1$, como «cenário pessimista» pressupõe-se que a eficiência de assimilação é 1.

Subsequentemente, é possível estimar o BMF_K máximo com a equação A7.4, e deve ser identificado como um valor «muito inferior a» (<<). Por exemplo, no que diz respeito a um estudo levado a cabo com uma taxa de alimentação de 3 %, uma semivida de depuração inferior a 3 dias, e um «cenário pessimista» para α de 1, é provável que o BMF_K seja inferior em cerca de 0,13. Tomando em consideração o objetivo desta estimativa e o facto de que os valores serão de caráter prudente, não é necessário corrigi-los em função da diluição de crescimento nem do teor de lípidos nos peixes e no alimento.

▼M7

Apêndice 8

METODOLOGIAS PARA ESTIMAR BCF PROVISÓRIOS A PARTIR DOS DADOS RECOLHIDOS NO ESTUDO DE EXPOSIÇÃO POR VIA ALIMENTAR

O método por via alimentar é incluído no presente método de ensaio para o ensaio da bioacumulação de substâncias que não podem, na prática, ser ensaiadas através do método de exposição aquosa. O método de exposição aquosa apresenta um fator de bioconcentração, ao passo que o método por via alimentar conduz diretamente a informações sobre o potencial de bioamplificação da alimentação. Em muitos regimes de segurança química são exigidas informações sobre a bioconcentração aquática (por exemplo, na avaliação dos riscos e no Sistema Mundial Harmonizado de Classificação). Portanto, é necessário utilizar os dados gerados no estudo alimentar para estimar um fator de bioconcentração comparável aos ensaios realizados de acordo com o método de exposição aquosa ([1]). A presente secção explora metodologias que podem ser seguidas para este efeito, reconhecendo, no entanto, as deficiências inerentes às estimativas.

O estudo alimentar mede a depuração para dar uma constante de velocidade de depuração, k_2. Caso seja possível estimar uma constante de velocidade de fixação com os dados disponíveis para a situação na qual os peixes foram expostos à substância em estudo através da água, é possível estimar um BCF cinético.

A estimativa de uma constante de velocidade de depuração para a exposição de uma substância em estudo na água depende de muitos pressupostos, todos os quais contribuirão para a incerteza da estimativa. Além disso, esta metodologia para estimar um BCF pressupõe que a velocidade global de depuração (incluindo fatores contribuintes como a distribuição no corpo e os processos de depuração individuais) é independente da técnica de exposição utilizada para produzir uma carga corporal da substância em estudo.

Os principais pressupostos inerentes à metodologia de estimativa podem ser resumidos do modo apresentado infra.

A depuração no seguimento da fixação por via alimentar é idêntica à depuração na sequência da exposição no que se refere a uma determinada substância

A fixação a partir da água deve seguir uma cinética de primeira ordem

Consoante o método utilizado para estimar a fixação:

— A fixação pode ser correlacionada apenas com o peso dos peixes;

— A fixação pode ser correlacionada apenas com o coeficiente de partição octanol-água da substância;

— A fixação pode ser correlacionada com uma combinação do peso dos peixes e do coeficiente de partição octanol-água da substância;

— Os fatores passíveis de afetar a fixação num estudo de exposição aquosa na prática, como a biodisponibilidade da substância, a adsorção para o equipamento, o tamanho molecular, etc., têm pouco efeito;

— e, fundamentalmente:

A base de dados («série de rastreio») utilizada para desenvolver o método de estimativa da fixação é representativa da substância em apreço.

Várias publicações na literatura aberta obtiveram equações que relacionam a fixação a partir da água nos peixes através das guelras com o coeficiente de partição octanol-água de uma substância, o peso dos peixes (1) (2) (3) (4), o volume e/ou teor de lípidos, a permeação/difusão por membrana (5) (6), o volume de ventilação dos peixes (7) e através de uma metodologia de fugacidade/ /balanço de massas (8) (9) (10). Crookes & Brooke (11) apresentam, neste

([1]) Na natureza, a via que conduz à exposição mais elevada nos ambientes aquosos é provavelmente a ingestão no que diz respeito à substâncias muito hidrófobas e, como tal, um BCF estimado não é estritamente representativo do potencial de bioacumulação de uma substância deste tipo.

▼M7

âmbito, uma avaliação pormenorizada destes métodos. Uma publicação de Barber (12) incidiu sobre a modelação da bioacumulação através da fixação por via alimentar, o que também é útil neste contexto, uma vez que inclui contributos de modelos de velocidade de fixação através das guelras. Uma secção do documento de base do protocolo alimentar de 2004 (13) também se dedicou a este aspeto.

A maioria destes modelos parece ter sido obtida com bases de dados limitadas. No que se refere aos modelos nos quais as informações da base de dados utilizada para desenvolver o modelo se encontram disponíveis, afigura-se que os tipos de substâncias utilizados são muitas vezes de estrutura ou classe semelhantes (em termos de funcionalidade, por exemplo, organoclorados). Isto aumenta a incerteza na utilização de um modelo para prever uma constante de velocidade de fixação para um tipo de substância diferente, para além de considerações específicas do ensaio, como a espécie, a temperatura, etc.

Uma revisão das técnicas disponíveis (11) sublinhou que não existe um método «mais correto» do que os restantes. Portanto, deve apresentar-se uma fundamentação clara para o modelo utilizado. Sempre que se encontrem disponíveis vários métodos cuja utilização seja justificável, pode ser prudente apresentar várias estimativas de k_1 (e também do BCF) ou um intervalo de valores k_1 (e do BCF) de acordo com vários métodos de estimativa da fixação. Contudo, tomando em consideração as diferenças nos tipos de modelos e conjuntos de dados utilizados para o seu desenvolvimento, não seria adequado adotar um valor médio das estimativas obtidas de várias formas.

Alguns investigadores postularam que este tipo de estimativas do BCF exige uma correção em função da biodisponibilidade para tomar em consideração a adsorção de uma substância para o carbono orgânico dissolvido (COD) em condições de exposição aquosa, de modo a que a estimativa esteja em conformidade com os resultados dos estudos de exposição aquosa (por exemplo, (13) (14)). Contudo, esta correção pode não ser adequada devido aos níveis reduzidos de COD necessários num estudo de exposição aquosa para uma estimativa de um cenário pessimista (*ou seja,* rácio entre a substância biodisponível e a substância determinada na solução). No respeitante às substâncias muito hidrófobas, a fixação nas guelras pode ser limitada pela taxa de difusão passiva perto da superfície das guelras; neste caso, é possível que a correção tome este efeito em consideração ao invés do efeito para o qual foi concebida.

É aconselhável incidir em métodos que exijam informações para as quais existem dados imediatamente disponíveis no que se refere às substâncias ensaiadas de acordo com o estudo alimentar aqui descrito (*ou seja,* log K_{OW}, peso dos peixes). É possível aplicar outros métodos que exijam informações mais complexas, mas estes podem necessitar de medições adicionais no ensaio ou conhecimentos pormenorizados sobre a substância em estudo ou espécies de peixes que podem não estar amplamente disponíveis. Além disso, a seleção do modelo pode ser influenciada pelo nível de validação e o domínio de aplicabilidade (ver (11) para uma revisão e comparação de diferentes métodos).

Importa tomar em consideração que a estimativa de k_1 resultante e o BCF estimado são incertos e pode ser necessário tratá-los numa abordagem de suficiência de prova em conjunto com o BMF obtido e os parâmetros da substância (por exemplo, tamanho molecular) para obter um quadro global do potencial de bioacumulação de uma substância. A interpretação e utilização destes parâmetros podem depender do quadro regulamentar.

REFERÊNCIAS

1) Sijm D.T.H.M., Pärt P. and Opperhuizen A. (1993), The influence of temperature on the uptake rate constants of hydrophobic compounds determined by the isolated perfused gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquat. Toxicol. 25: 1-14.

2) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., Part P. and Opperhuizen A. (1994), Experimentally determined blood and water flow limitations for uptake of hydrophobic compounds using perfused gills of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss): Allometric applications. Aquat. Toxicol. 30: 325-341.

3) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. and Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined *in vivo* and in isolated perfused gills. Toxicol. Appl. Pharmacol. 131: 130-135.

▼M7

4) Barber M.C. (2003), A review and comparison of models for predicting dynamic chemical bioconcentration in fish. Environ. Toxicol. Chem. 22: 1963-1992.

5) Opperhuizen A. (1986), Bioconcentration of hydrophobic chemicals in fish, in Aquatic Toxicology and Environmental Fate, STP 921, Poston, T.M. and Purdy, R., Editors. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, USA: 304-315.

6) Arnot J.A. and Gobas F.A.P.C. (2004), A food web bioaccumulation model for organic chemicals in aquatic ecosystems. Environ. Toxicol. Chem. 23: 2343-2355.

7) Thomann R.V. (1989), Bioaccumulation model of organic chemical distribution in aquatic food chains. Environ. Sci. Technol. 23: 699-707.

8) Hendriks A.J., van der Linde A., Cornelissen G. and Sijm D.T.H.M. (2001). The power of size. 1. Rate constants and equilibrium ratios for accumulation of organic substances related to octanol-water partition ratio and species weight. Environ. Toxicol. Chem. 20: 1399-1420.

9) Campfens J. and Mackay D. (1997), Fugacity-based model of PCB bioaccumulation in complex aquatic food webs. Environ. Sci. Technol. 31: 577-583.

10) Arnot J.A. and Gobas F.A.P.C. (2003), A generic QSAR for assessing the bioaccumulation potential of organic chemicals in aquatic food webs. QSAR Comb. Sci. 22: 337-345.

11) Crookes M. and Brooke D. (2010), Estimation of fish bioconcentration factor (BCF) from depuration data. Draft Report. Environmental Agency, Bristol, UK.

12) Barber M.C. (2008), Dietary uptake models used for modelling the bioaccumulation of organic contaminants in fish. Environ. Toxicol. Chem. 27: 755-777

13) Anónimo (2004), Background document to the fish dietary study protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.

14) Gobas F. and Morrison H. (2000), Bioconcentration and biomagnification in the aquatic environment, in Handbook of property estimation methods for chemicals, Boethling, R.S. and Mackay, D., Editors. Lewis Publishers, Boca Racton, FL, USA: 189-231.

▼B

C.14. ENSAIO DE CRESCIMENTO JUVENIL EM PEIXES

1. MÉTODO

O presente método de ensaio de toxicidade no crescimento baseia-se na publicação OECD TG 215 (2000) (normas de ensaio da OCDE).

1.1. INTRODUÇÃO

O presente ensaio, concebido para avaliar os efeitos da exposição prolongada a substâncias químicas no crescimento de peixes juvenis, baseia-se num método desenvolvido e testado na União Europeia através de um ensaio interlaboratorial (1) (3) e destinado a determinar os efeitos de substâncias químicas no crescimento de juvenis de truta arco-íris *(Oncorynchus mykiss)* em condições de escoamento. Podem usar-se para ensaio outras espécies relativamente às quais existam obras de referência. As publicações sobre ensaios de crescimento em peixe-zebra *(Danio rerio*) (2) (4) (5) e em peixinho dos arrozais *(Oryzias latipes*) (6) (7) (8), por exemplo, contêm informações úteis para este tipo de estudos.

Ver também a introdução geral, parte C.

1.2. DEFINIÇÕES

Menor concentração com efeito observável (MCCEO): é a menor concentração de ensaio da substância a ensaiar para a qual se observa um efeito significativo (a $p < 0,05$) quando comparado com o controlo. No entanto, todas as concentrações de ensaio superiores à MCCEO devem ter um efeito prejudicial igual ou superior ao verificado com a MCCEO.

Concentração sem efeito observável (CSEO): é a concentração de ensaio cujo valor se situa imediatamente abaixo do valor da MCCEO.

$\mathbf{EC_x}$ no presente método de ensaio, é a concentração da substância de ensaio que causa uma variação de x % na taxa de crescimento dos peixes relativamente aos controlos.

Taxa de carga: é o peso fresco de peixe por volume de água.

Densidade de ocupação: é o número de peixes por volume de água.

Taxa específica de crescimento individual de um peixe: expressa a taxa de crescimento de um indivíduo relativamente ao seu peso inicial.

Taxa específica média de crescimento de um tanque: expressa a taxa média de crescimento da população de um tanque para uma dada concentração da substância de ensaio.

Taxa de crescimento pseudo-específica: expressa a taxa de crescimento individual relativamente ao valor médio do peso inicial da população do tanque.

▼B

1.3. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

Os peixes juvenis em fase exponencial de crescimento são pesados, colocados em câmaras de ensaio e expostos a uma gama de concentrações subletais da substância de ensaio dissolvida em água. O ensaio deverá realizar-se preferencialmente em condições de escoamento; se tal não for possível, poderão usar-se condições semiestáticas (estático — renovação) apropriadas. A duração do ensaio é de 28 dias. Os peixes são alimentados diariamente. A quantidade de alimento fornecido aos peixes é calculada com base no seu peso inicial e pode ser reavaliada decorridos 14 dias de ensaio. No final do ensaio, os peixes são pesados novamente. Os efeitos nas taxas de crescimento são analisados por meio de um modelo de regressão, de forma a estimar a concentração que provocaria uma variação de x % na taxa de crescimento, ou seja, CEx (por exemplo, CE10, CE20 ou CE30). Em alternativa, os dados podem ser comparados com valores de controlo, de modo a determinar a menor concentração com efeito observável (MCCEO) e, a partir desse valor, a concentração sem efeito observável (CSEO).

1.4. INFORMAÇÃO SOBRE A SUBSTÂNCIA DE ENSAIO

Deverão estar disponíveis resultados de um ensaio de toxicidade aguda (ver método de ensaio C.1.) realizado de preferência com a espécie escolhida para este ensaio, o que implica que a solubilidade em água e a pressão de vapor da substância de ensaio são conhecidas, e que existe um método analítico fiável para a quantificação da substância nas soluções a ensaiar, relativamente ao qual a exactidão e o limite de detecção são conhecidos e se encontram descritos.

A fórmula estrutural, o grau de pureza, a estabilidade em água, a estabilidade à luz, os valores de pK_a e P_{ow} e os resultados de um ensaio de biodegradabilidade «fácil» da substância de ensaio constituem informações úteis (ver método de ensaio C.4).

1.5. VALIDADE DO ENSAIO

Um ensaio é considerado válido quando são cumpridas as seguintes condições:

— no(s) controlo(s), a mortalidade no final do ensaio não deverá ser superior a 10 %,

— o aumento do peso médio dos peixes no(s) controlo(s) deverá ser suficiente para permitir a detecção da mínima variação da taxa de crescimento considerada significativa. Os resultados de um ensaio interlaboratorial (3) demonstraram que, para a truta arco-íris, o peso médio dos peixes nos controlos deve sofrer, ao longo de 28 dias, um aumento que seja, no mínimo, equivalente a metade (isto é, a 50 %) do seu peso médio inicial; por exemplo, peso inicial: 1 g/peixe (= 100 %), peso final após 28 dias: ≥ 1,5 g/peixe (≥ 150 %),

— a concentração do oxigénio dissolvido deve ser igual ou superior a 60 % do valor da saturação com ar (VSA) ao longo de todo o ensaio,

— a variação da temperatura da água não deve ser superior a ± 1°C entre as diferentes câmaras de ensaio em qualquer momento do ensaio nem deverá ultrapassar um intervalo de 2°C dentro das gamas de temperatura especificadas para as espécies a ensaiar (apêndice 1).

1.6. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.6.1. **Equipamento**

Equipamento normal de laboratório e, mais especificamente, o seguinte:

a) Medidores de oxigénio e de pH;

▼B

b) Equipamento para determinação da dureza e alcalinidade da água;

c) Aparelhos apropriados para o controlo da temperatura e que permitam, de preferência, a sua monitorização contínua;

d) Tanques construídos com um material quimicamente inerte e de capacidade adequada à carga e à densidade de ocupação recomendadas (ver ponto 1.8.5 e apêndice 1);

e) Balança de precisão apropriada (isto é, com uma exactidão de ± 0,5 %).

1.6.2. **Água**

Qualquer água que sustente a sobrevivência e o crescimento adequados a longo prazo, da espécie em ensaio, poderá ser utilizada como água de ensaio. A qualidade da água deve ser mantida constante durante o ensaio. Os valores de pH devem situar-se entre 6,5 e 8,5, não devendo, num dado ensaio, sofrer variações superiores a ± 0,5 pH unidades. Recomenda-se uma dureza superior a 140 mg/l (expressos em $CaCO_3$). Para assegurar que a água de diluição não influencie indevidamente o resultado do ensaio (por complexação da substância de ensaio, por exemplo), deverão ser regularmente retiradas amostras para análise. Devem efectuar-se medições de metais pesados (por exemplo, Cu, Pb, Zn, Hg, Cd e Ni), principais aniões e catiões (por exemplo, Ca, Mg, Na, K, Cl e SO_4), pesticidas (por exemplo, pesticidas organofosforados totais e organoclorados totais), carbono orgânico total e sólidos em suspensão. Nos casos em que se sabe que a água de diluição mantém uma qualidade relativamente constante, estas medições deverão ser efectuadas, por exemplo, de três em três meses. Caso se demonstre que a qualidade da água se mantém inalterada durante, pelo menos, um ano, as determinações podem ser menos frequentes (de seis em seis meses, por exemplo). No apêndice 2 apresentam-se algumas características químicas de uma água de diluição aceitável.

1.6.3. **Soluções de ensaio**

As soluções de ensaio com as concentrações escolhidas são preparadas por diluição de uma solução de reserva.

A solução de reserva deve ser preparada, preferencialmente, apenas por mistura ou agitação da substância de ensaio na água de diluição, utilizando meios mecânicos (agitação ou dispersão ultra-sónica, por exemplo). Podem ser utilizadas colunas de saturação (colunas de solubilidade) para obter uma solução de reserva concentrada adequada.

Em alguns casos, pode ser necessário utilizar solventes ou dispersantes (agentes solubilizantes) para produzir uma solução de reserva com a concentração adequada. A acetona, o etanol, o metanol, o dimetilsulfóxido, a dimetilformamida e o trietilenoglicol são exemplos de solventes adequados. Dispersantes adequados são, por exemplo, o Cremofor RH40, o Tween 80, a metilcelulose a 0,01 % e o HCO-40. Deve ter-se cuidado ao utilizar agentes facilmente biodegradáveis (como a acetona, por exemplo) e/ou compostos altamente voláteis, uma vez que estes podem causar problemas relacionados com o desenvolvimento de bactérias nos ensaios em que for utilizado o método de escoamento. Quando se utiliza um agente solubilizante, este não deve afectar de forma significativa o crescimento dos peixes, nem produzir efeitos adversos observáveis nos juvenis, de acordo com um controlo na presença apenas do solvente.

▼B

Para os ensaios por escoamento, é necessário utilizar um sistema que distribua e dilua continuamente a solução de reserva da substância de ensaio (por exemplo, uma bomba de medição, um diluidor proporcional ou um sistema saturador), por forma a fornecer uma série de concentrações às câmaras de ensaio. As taxas de fluxo das soluções de reserva e da água de diluição devem ser verificadas a intervalos regulares durante o ensaio, de preferência diariamente, e não devem variar mais do que 10 % ao longo do ensaio. Os resultados de um ensaio interlaboratorial demonstraram que, para a truta arco-íris, é adequado utilizar uma frequência de remoção de água de 6 l/g de peixe/dia (ver ponto 1.8.2.2).

Para os ensaios semiestáticos (de renovação), a frequência de renovação do meio dependerá da estabilidade da substância de ensaio. No entanto, recomenda-se uma renovação diária da água. Se, a partir de ensaios de estabilidade preliminares (ver ponto 1.4), se demonstrar que a concentração da substância de ensaio não é estável (isto é, se estiver fora da gama de 80-120 % do valor nominal ou se for inferior a 80 % da concentração medida inicialmente) durante o período de renovação, deve considerar-se a utilização de um ensaio por escoamento.

1.6.4. **Selecção de espécies**

A espécie recomendada para o presente ensaio é a truta arco-íris *(Oncorhynchus mykiss),* uma vez que a maior parte da informação disponível foi obtida a partir de ensaios interlaboratoriais realizados com esta espécie (1) (3). Podem ser usadas outras espécies relativamente às quais exista documentação de referência embora o método de ensaio possa ter de ser adaptado de modo a proporcionar as condições de ensaio adequadas. Por exemplo, existem obras de referência relativas ao peixe-zebra *(Danio rerio)* (4) (5) e ao peixinho dos arrozais (*Oryzias latipes*) (6) (7) (8). Neste caso, o relatório deverá indicar o critério para a selecção das espécies e o método experimental.

1.6.5. **Confinação dos peixes**

Os peixes de ensaio devem ser seleccionados a partir da população de uma única reserva (de preferência proveniente da mesma desova), que tenha sido mantida em condições de qualidade da água e de iluminação idênticas às usadas no ensaio durante, pelo menos, as duas semanas anteriores à sua realização. Durante o período de confinação e no decorrer do ensaio, os peixes devem ser alimentados preferencialmente com uma ração equivalente a 4 % do peso corporal por dia; no mínimo, a ração diária deverá corresponder a 2 % do peso corporal.

Decorrido um período inicial de 48 h deverá registar-se a mortalidade e aplicar os seguintes critérios:

— mortalidade superior a 10 % da população num período de sete dias: o lote é rejeitado na sua totalidade,

— mortalidade de 5 % a 10 % da população: aclimatação durante um período adicional de sete dias: caso se verifique mortalidade superior a 5 % durante este segundo período, deverá rejeitar-se a totalidade do lote,

— mortalidade inferior a 5 % da população num período de sete dias: o lote é aceite.

Os peixes não devem receber qualquer tratamento de doenças nas duas semanas anteriores ao ensaio nem durante a realização do mesmo.

▼B

1.7. PLANEAMENTO DO ENSAIO

O «planeamento do ensaio» consiste na escolha do número e intervalos das concentrações de ensaio, do número de tanques para cada concentração e do número de peixes por tanque. Um planeamento de ensaio correctamente elaborado deverá considerar os seguintes aspectos:

a) O objectivo do estudo;

b) O método de análise estatística a utilizar;

c) A disponibilidade e o custo dos meios experimentais.

A definição do objectivo deverá, se possível, especificar o rigor estatístico para o qual é necessário ocorrer uma determinada diferença, de modo a ser detectada (na taxa de crescimento, por exemplo). Em alternativa, poderá especificar a precisão com que será necessário determinar a CE_X de modo a permitir a sua estimativa (por exemplo, com x = 10, 20 ou 30; de preferência, o valor de x não deve ser inferior a 10). Se nenhuma destas informações for disponibilizada, não será possível dar uma indicação correcta da dimensão do estudo.

Importa ter presente que um planeamento considerado óptimo (ou seja, o que utiliza da melhor forma os recursos disponíveis) para análise através de um dado método estatístico poderá não o ser para outro método. Assim, um planeamento concebido para determinação da MCCEO/CSEO não será idêntico a um outro concebido para análise por regressão.

Na maioria dos casos, pelas razões analisadas por Stephan e Rogers (9), considera-se que a análise de regressão é preferível à análise de variância. No entanto, no caso de não se encontrar um modelo de regressão adequado ($r^2 < 0,9$), deverá usar-se a estimativa de CSEO/ /MCCEO.

1.7.1. **Planeamento para análise por regressão**

O planeamento de um ensaio a analisar por regressão deverá considerar os seguintes aspectos:

a) As concentrações testadas no ensaio deverão, obrigatoriamente, incluir as concentrações às quais se observam determinadas percentagens de efeito (por exemplo, $CE_{10,20,30}$) e abranger a gama de concentrações para as quais o efeito da substância de ensaio é significativo. As estimativas das concentrações responsáveis por determinadas percentagens de efeito poderão ser feitas com maior precisão se os respectivos valores se localizarem a meio da gama de concentrações ensaiadas. A realização de um ensaio preliminar para determinação da gama de concentrações poderá ser útil na escolha das concentrações de ensaio apropriadas;

b) De modo a permitir a aplicação de um modelo estatístico, o ensaio deve incluir, no mínimo, um tanque de controlo e cinco tanques adicionais com diferentes concentrações da substância de ensaio. Caso se utilize um agente solubilizante, o ensaio deverá incluir, além da série de ensaio, um controlo contendo o agente solubilizante na maior das concentrações testadas no ensaio (ver pontos 1.8.3 e 1.8.4);

c) Embora se possam utilizar séries geométricas ou séries logarítmicas adequadas (10) (ver apêndice 3), recomenda-se o espaçamento logarítmico das concentrações de ensaio;

▼B

d) Se existirem mais do que seis tanques, os tanques excedentes devem ser usados para repetição ou distribuídos ao longo da gama de concentrações de forma a reduzir o intervalo entre níveis. Não há preferência por qualquer destes procedimentos.

1.7.2. **Planeamento para a estimativa de CSEO/MCCEO através de análise de variância (ANOVA)**

Sempre que possível, devem usar-se repetições dos tanques correspondentes a cada concentração; a análise estatística deve efectuar-se ao nível de cada tanque (11). Sem repetições, não é possível analisar a variabilidade entre tanques, mas apenas a atribuível à variabilidade entre cada um dos elementos da população. No entanto, os resultados de um estudo publicado (12) demonstraram que, no caso examinado, a variabilidade entre tanques era muito pequena quando comparada com a variabilidade dentro de cada tanque (isto é, entre os peixes de um tanque). Assim, considera-se a realização de análise estatística a nível individual uma alternativa relativamente aceitável.

Convencionalmente, utilizam-se pelo menos cinco concentrações de ensaio de uma série geométrica com um factor que, de preferência, não deverá ser superior a 3,2.

Em geral, em ensaios com tanques repetidos, o número de repetições de tanques de controlo (e portanto, o número de peixes) deverá ser o dobro do usado em cada uma das concentrações de ensaio, as quais deverão ser de dimensão idêntica (13) (14) (15). Em contrapartida, na ausência de tanques repetidos, o número de peixes no grupo de controlo deve ser idêntico ao usado em cada concentração de ensaio.

Caso se utilize uma ANOVA baseada em tanques e não em indivíduos (o que implicaria a marcação individual dos peixes ou o uso de taxas de crescimento pseudo-específicas (ver ponto 2.1.2), o ensaio deverá incluir as repetições necessárias para a determinação do desvio-padrão relativo aos «tanques nas mesmas concentrações». Assim sendo, a estimativa do erro na análise de variância deverá considerar, no mínimo, cinco graus de liberdade (11). Se o ensaio incluir apenas repetições dos controlos, a variabilidade do erro poderá ser desviada, uma vez que pode aumentar com o valor médio da taxa de crescimento em questão. Dado ser provável que a taxa de crescimento diminua com o aumento da concentração, esta situação poderá conduzir a uma sobrestimação da variabilidade.

1.8. PROCEDIMENTO

1.8.1. **Selecção e pesagem dos peixes de ensaio**

É importante minimizar a variação entre o peso de cada peixe no início do ensaio. O apêndice 1 contém as gamas de pesos aceitáveis para as diferentes espécies recomendadas para uso neste ensaio. A gama de pesos individuais em todo o lote de peixes no início do ensaio deve situar-se, de preferência, dentro dos limites de ± 10 % da média aritmética dos pesos, não devendo, em circunstância alguma, exceder os 25 %. Por forma a estimar o peso médio, recomenda-se a pesagem de uma amostra do lote de peixe antes de dar início ao ensaio.

▼B

A população de reserva deve ser privada de alimento durante as 24 horas que antecedem o início do ensaio. Os peixes deverão então ser escolhidos de forma aleatória. Utilizando um anestésico geral (por exemplo, uma solução aquosa de 100 mg/l de metanosulfonato de tricaína [MS 222], neutralizada por adição de duas partes de bicarbonato de sódio por cada parte de MS 222), os peixes devem ser pesados individualmente por forma a determinar o peso fresco (secos com papel absorvente) com a precisão indicada no apêndice 1. Os peixes cujo peso se encontre dentro da gama pretendida são seleccionados e distribuídos aleatoriamente pelos recipientes de ensaio. Deve registar-se o peso fresco total dos peixes em cada recipiente. O uso de anestésicos e a manipulação (incluindo a secagem com papel e a pesagem) podem causar tensão ou danos físicos nos peixes juvenis, especialmente em espécies de pequeno tamanho. Por essa razão, a manipulação dos juvenis deverá ser feita com o máximo cuidado para se evitarem esses efeitos nos animais do ensaio.

Os peixes voltam a ser pesados no 28.º dia de ensaio (ver ponto 1.8.6). No entanto, caso se considere necessário recalcular a ração alimentar, pode efectuar-se uma pesagem adicional no 14.º dia de ensaio (ver ponto 1.8.2.3). A detecção de alterações no tamanho dos peixes, a partir dos quais se possam ajustar as rações alimentares, poderá ser efectuada através de outros métodos, tais como a fotografia.

1.8.2. **Condições de exposição**

1.8.2.1. *Duração*

A duração mínima do ensaio é de 28 dias.

1.8.2.2. *Taxas de carga e densidades de ocupação*

É importante que a taxa de carga e a densidade de ocupação sejam adequadas à espécie usada no ensaio (ver apêndice 1). Uma densidade de ocupação demasiado elevada poderá dar origem a perturbações por superlotação, causadoras de reduções nas taxas de crescimento e, possivelmente, de doenças. Por outro lado, o uso de baixas densidades de ocupação poderá induzir comportamentos territoriais, que poderão também afectar o crescimento. Em todo o caso, a taxa de carga deverá ser suficientemente baixa para permitir manter uma concentração de oxigénio dissolvido de pelo menos 60 % VSA sem arejamento. Um ensaio interlaboratorial (3) demonstrou que, para a truta arco-íris, é adequado utilizar uma taxa de carga de 16 trutas de 3-5 g num volume de 40 1. A frequência de remoção de água recomendada durante o período de ensaio é de 6 l/g de peixe/dia.

1.8.2.3. *Alimentação*

Os peixes devem ser nutridos com um alimento apropriado (apêndice 1), administrado a um ritmo suficiente para induzir uma taxa de crescimento aceitável. Deverão ser tomadas as precauções necessárias para evitar o crescimento de microorganismos e a turbidez da água. No caso da truta arco-íris, considera-se adequada uma quantidade diária correspondente a 4 % do seu peso corporal (3) (16) (17) (18). A ração diária pode ser dividida em duas porções iguais, que serão fornecidas aos peixes em duas tomas separadas por um intervalo mínimo de cinco horas. O cálculo da ração baseia-se no peso total inicial dos peixes em cada recipiente. No caso de se efectuar uma segunda pesagem dos peixes no 14.º dia de ensaio, poderá efectuar-se um novo cálculo da ração alimentar. Os peixes devem ser privados de alimento durante o período de 24 horas que antecede a pesagem.

▼B

Os alimentos não consumidos e a matéria fecal devem ser removidos diariamente dos recipientes de ensaio, limpando-se cuidadosamente o fundo de cada tanque com um sistema de sucção.

1.8.2.4. *Luz e temperatura*

O fotoperíodo e a temperatura da água do ensaio devem ser apropriados para a espécie de ensaio (apêndice 1).

1.8.3. **Concentrações de ensaio**

Normalmente, deverão ser utilizadas cinco concentrações da substância de ensaio, independentemente do planeamento do ensaio (ver ponto 1.7.2). O conhecimento prévio da toxicidade da substância de ensaio (obtido a partir de um ensaio de toxicidade aguda e/ou de um ensaio para determinação de gama de concentrações, por exemplo) deverá ajudar na selecção das concentrações de ensaio apropriadas. Deve fornecer-se uma justificação quando se utilizam menos de cinco concentrações. A concentração de ensaio mais elevada não deverá exceder o limite de solubilidade da substância em água.

Quando se utiliza um agente solubilizante para facilitar a preparação de soluções de reserva, a sua concentração final não deve ser superior a 0,1 ml/l e, de preferência, deverá ser a mesma em todos os recipientes de ensaio (ver ponto 1.6.3). No entanto, devem fazer-se todos os esforços para evitar a utilização destes produtos.

1.8.4. **Controlos**

O número de controlos em água de diluição depende do planeamento do ensaio (ver pontos 1.7-1.7.2). Se se utilizar um agente solubilizante, o ensaio deverá incluir controlos com essa substância em número idêntico aos controlos em água de diluição.

1.8.5. **Frequência das determinações analíticas e medições**

Durante o ensaio, as concentrações da substância de ensaio deverão ser determinadas a intervalos regulares (ver abaixo).

Nos ensaios por escoamento, as taxas de fluxo das soluções de reserva do agente de diluição e da substância tóxica devem ser verificadas a intervalos regulares, de preferência diariamente, não devendo variar mais do que 10 % ao longo do ensaio. Nos ensaios em que se espera que as concentrações da substância de ensaio se mantenham dentro de um intervalo de ± 20 % dos valores nominais (isto é, dentro da gama 80-120 %; ver pontos 1.6.2 e 1.6.3), recomenda-se que, no mínimo, a maior e a menor das concentrações de ensaio sejam analisadas no início do estudo e, a partir daí, semanalmente. Para os ensaios em que não se espera que a concentração da substância de ensaio se mantenha dentro do intervalo de ± 20 % do valor nominal (com base nos dados de estabilidade da substância), será necessário analisar todas as concentrações de ensaio, seguindo o mesmo regime.

Nos ensaios semiestáticos (de renovação), em que se espera que a concentração da substância de ensaio se mantenha dentro de um intervalo de ± 20 % do valor nominal, recomenda-se que, no mínimo, a maior e a menor das concentrações de ensaio sejam analisadas logo após a sua preparação e imediatamente antes da renovação, no início do estudo e, a partir daí, semanalmente. Para os ensaios em que não se espera que a concentração da substância de ensaio se mantenha dentro do intervalo de ± 20 % do valor nominal, será necessário analisar todas as concentrações de ensaio, seguindo um regime idêntico ao recomendado para substâncias mais estáveis.

▼B

Recomenda-se que os resultados se baseiem em concentrações medidas. No entanto, caso existam provas de que a concentração da substância a ensaiar na solução se manteve, durante o ensaio, no intervalo de ± 20 % do valor nominal ou do valor da concentração inicial medida, os resultados poderão basear-se em valores nominais ou em valores medidos.

As amostras podem precisar de ser centrifugadas ou filtradas (utilizando um poro com 0,45 μm, por exemplo). Embora a centrifugação seja o procedimento recomendado, as amostras podem ser filtradas desde que o material de ensaio não adsorva aos filtros.

Durante o ensaio, o oxigénio dissolvido, o pH e a temperatura devem ser medidos em todos os recipientes de ensaio. A dureza total, a alcalinidade e a salinidade (se relevante) devem ser medidas nos controlos e num recipiente com a concentração mais elevada. O oxigénio dissolvido e a salinidade (se relevante) devem ser medidos três vezes (no início, a meio e no fim do ensaio). Nos ensaios semiestáticos, recomenda-se que o oxigénio dissolvido seja medido com maior frequência, de preferência antes e após cada renovação da água ou, pelo menos, uma vez por semana. O pH deve ser medido no início e no fim de cada renovação da água nos ensaios de renovação estática e, pelo menos, semanalmente nos ensaios por escoamento. A dureza e a alcalinidade devem ser medidas uma vez em cada ensaio. A temperatura deverá ser, de preferência, monitorizada continuamente, pelo menos, num recipiente de ensaio.

1.8.6. **Observações**

Peso: No fim do ensaio, todos os peixes sobreviventes devem ser pesados, avaliando-se o peso fresco (seco com papel absorvente). A pesagem pode ser feita individualmente ou em grupos por recipiente de ensaio; este último procedimento é preferível, uma vez que a pesagem em separado exige a marcação individual dos peixes. Se for necessário efectuar pesagens individuais para determinar taxas específicas de crescimento de cada um dos peixes, a técnica de marcação adoptada deverá evitar perturbar os animais (poderão utilizar-se alternativas a marcação por congelação, tais como a utilização de linha de pesca fina colorida).

Durante o período do ensaio, os peixes devem ser observados diariamente, devendo ser assinaladas quaisquer anomalias externas (tais como hemorragia, descoloração) ou comportamentos anómalos. A mortalidade deverá ser registada, e os peixes mortos retirados o mais rapidamente possível. Os peixes mortos não são substituídos, uma vez que a taxa de carga e a densidade de ocupação são suficientes para impedir que alterações no número de peixes por tanque afectem o crescimento. No entanto, a taxa de alimentação deverá ser reajustada.

2. **DADOS E RELATÓRIO**

2.1. TRATAMENTO DOS RESULTADOS

Recomenda-se que um técnico estatístico participe tanto no planeamento como na análise do ensaio, uma vez que o método permite variações consideráveis no plano experimental no que se refere, por exemplo, ao número de recipientes de ensaio, ao número de concentrações de ensaio, ao número de peixes, etc. Devido às opções disponíveis quanto ao planeamento do ensaio, não se fornece qualquer orientação específica relativamente aos procedimentos estatísticos.

▼B

As taxas de crescimento não devem ser calculadas em recipientes de ensaio em que a mortalidade seja superior a 10 %. No entanto, deve indicar-se a taxa de mortalidade para todas as concentrações de ensaio.

Seja qual for o método utilizado na análise dos dados, o conceito fundamental é a taxa específica de crescimento r entre os tempos t_1 e t_2. Esta pode ser definida de várias formas, dependendo de os peixes serem ou não marcados individualmente, bem como da necessidade de determinar uma média por tanque.

$$r_1 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_2 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_3 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

em que

r_1 = taxa específica de crescimento individual

r_2 = taxa específica de crescimento média por tanque

r_3 = taxa pseudo-específica de crescimento

w_1, w_2 = pesos de determinado peixe nos tempos t_1 e t_2, respectivamente

$\log_e w_1$ = logaritmo do peso de um indivíduo no início do período de estudo

$\log_e w_2$ = logaritmo do peso de um indivíduo no final do período de estudo

$\log_e W_1$ = média dos logaritmos dos valores de w_1 para os peixes do tanque no início do período de estudo

$\log_e W_2$ = média dos logaritmos dos valores de w_2 para os peixes do tanque no final do período de estudo

t_1, t_2 = tempo (em dias) no início e no final do período de estudo

As taxas r_1, r_2, r_3 podem ser calculadas para o período «dia 0-dia 28», e, quando apropriado (isto é, quando se efectuaram medições no 14.º dia de ensaio), para os períodos «dia 0-dia 14» e «dia 14-dia 28».

2.1.1. **Análise de resultados por regressão (modelo concentração-resposta)**

Este método de análise estabelece uma relação matemática adequada entre a taxa específica de crescimento e a concentração, permitindo a determinação da «CE_x», ou seja, de qualquer valor de CE. Utilizando este método não é necessário calcular o valor individual de r (r_1) e, em vez disso, a análise pode basear-se no valor médio de r por tanque (r_2). Este último procedimento é considerado preferível, e também mais adequado a espécies de menores dimensões.

As taxas específicas de crescimento médias por tanque (r_2) devem ser representadas graficamente em função da concentração, de forma a observar a relação concentração-resposta.

▼B

A relação entre r_2 e a concentração deve ser expressa através de um modelo apropriado, cuja escolha deve ser bem fundamentada.

Se os números de peixes sobreviventes em cada tanque forem diferentes, o procedimento de ajuste do modelo (seja este simples ou não linear) deverá ser ponderado por forma a permitir grupos de diferentes dimensões.

O método de ajuste do modelo deve permitir estimar, por exemplo, o valor de CE_{20} e da respectiva dispersão (erro-padrão ou intervalo de confiança). O gráfico do modelo ajustado deve ser apresentado em conjunto com os dados, de modo a permitir observar a adequação do ajuste realizado (9) (19) (20) (21).

2.1.2. **Análise de resultados para a determinação da MCCEO**

Caso o ensaio tenha incluído repetições dos tanques para todas as concentrações, a estimativa da MCCEO pode basear-se numa análise de variância (ANOVA) da taxa específica de crescimento média dos tanques (ver ponto 2.1), seguida da aplicação de um método apropriado de comparação entre o r médio para cada concentração e o r médio dos controlos [por exemplo, o teste de Dunnett ou o teste de Williams (13) (14) (15) (22)], a fim de identificar a menor concentração para a qual a diferença entre os dois valores é significativa a uma probabilidade de 0,05. Se não se verificarem os requisitos exigidos pelos métodos paramétricos — distribuição não normal (teste de Shapiro-Wilk, por exemplo) ou variância heterogénea (teste de Bartlett) –, poderá ser equacionada a transformação dos dados de forma a homogeneizar as variâncias antes de efectuar a ANOVA. Em alternativa, poderá realizar-se uma ANOVA ponderada.

Na ausência de repetições dos tanques para cada concentração, uma ANOVA com base em dados de tanques será insensível ou impossível. Nestes casos, um compromisso aceitável será a realização da ANOVA com base nos valores individuais da taxa pseudo-específica de crescimento r_3.

O valor médio de r_3 para cada concentração de ensaio poderá depois ser comparado com o valor médio de r_3 para os controlos, podendo a MCCEO ser determinada de acordo com o procedimento acima descrito. Importa salientar que este método não tem em conta a variabilidade entre tanques, para além da que é devida à variabilidade entre indivíduos. No entanto, os resultados de um estudo publicado (9) demonstraram que a variabilidade entre tanques era muito pequena quando comparada com a variabilidade em cada tanque (ou seja, entre os peixes de um tanque). Se a análise não considerar os peixes de forma individual, deverá ser indicado o método de identificação de aberrações, bem como uma justificação para a sua utilização.

2.2. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados devem ser interpretados com precaução quando as concentrações tóxicas medidas nas soluções de ensaio ocorrem em níveis perto do limite de detecção do método analítico. A interpretação dos resultados de ensaios semiestáticos, em que a concentração da substância de ensaio diminui entre o momento em que a solução é preparada e a renovação, deve igualmente ser efectuada com precaução.

2.3. RELATÓRIO DO ENSAIO

O relatório do ensaio deverá incluir as seguintes informações:

▼B

2.3.1. **Substância de ensaio:**

— natureza física e propriedades físico-químicas relevantes,

— dados de identificação química, incluindo o grau de pureza e o método analítico de quantificação da substância de ensaio, quando apropriado.

2.3.2. **Espécie de ensaio:**

— nome científico, se possível,

— estirpe, dimensões, fornecedor, tratamentos prévios, etc.

2.3.3. **Condições de ensaio:**

— procedimento de ensaio utilizado (por exemplo, semiestático/renovação, por escoamento, carga, densidade de ocupação, etc.),

— planeamento do ensaio (por exemplo, o número de recipientes de ensaio, concentrações de ensaio e repetições, número de peixes por recipiente),

— método de preparação das soluções de reserva e frequência de renovação (quando utilizados, o agente solubilizante e a sua concentração devem ser indicados),

— valores nominais das concentrações de ensaio, médias dos valores medidos nos recipientes de ensaio e respectivos desvios-padrão, bem como o método através do qual estes foram obtidos; devem ainda ser fornecidas provas de que as medições se referem às concentrações da substância de ensaio em verdadeira solução,

— características da água de diluição: pH, dureza, alcalinidade, temperatura, concentração do oxigénio dissolvido, níveis de cloro residual (caso tenham sido medidos), carbono orgânico total, sólidos em suspensão, salinidade do meio de ensaio (caso tenha sido medida) e quaisquer outras medições efectuadas,

— qualidade da água dentro dos recipientes de ensaio: pH. dureza, temperatura e concentração do oxigénio dissolvido,

— informações pormenorizadas sobre a alimentação [por exemplo, tipo de alimento(s), proveniência, quantidade fornecida e frequência de administração].

2.3.4. **Resultados:**

— prova de que os controlos satisfazem os critérios de validade relativos à sobrevivência, bem como dados sobre a mortalidade observada em qualquer uma das concentrações ensaiadas,

— métodos de análise estatística utilizados, dados usados na análise estatística (repetições ou peixes), tratamento dos dados e justificação das técnicas usadas,

— tabelas contendo os dados relativos aos pesos individuais e médios dos peixes nos dias 0, 14 (caso tenham sido medidos) e 28, bem como os valores das taxas de crescimento médias por tanque ou pseudo-específicas (conforme seja apropriado) referentes aos períodos «dia 0-dia 28», ou, se possível, «dia 0-dia 14» e «dia 14-dia 28»,

— resultados da análise estatística (isto é, análise de regressão ou ANOVA), apresentados, de preferência, em tabelas de forma gráfica, bem como a MCCEO ($p = 0,05$) e a CSEO ou a CE_X; sempre que possível e apropriado, deverão indicar-se os erros-padrão,

▼B

— incidência de quaisquer reacções invulgares manifestadas pelos peixes e de quaisquer efeitos visíveis produzidos pela substância de ensaio.

3. REFERÊNCIAS

(1) Solbe J. F. de LG (1987). Environmental Effects of Chemicals (CFM 9350 SLD). Report on a UK Ring Test of a Method for Studying the Effects of Chemicals on the Growth Rate of Eish. WRc Report No PRD 1388-M/2.

(2) Meyer, A., Bierman, C. H. and Orti, G. (1993). The phylogenetic position of the zebrafish *(Danio* rerio), a model system in developmental biology: an invitation to the comparative method. Proc. R. Soc. Lond. B. 252, pp. 231-236.

(3) Ashley S., Mallett M. J. and Grandy N. J. (1990). EEC Ring Test of a Method for Determining the Effects of Chemicals on the Growth Rate of Fish. Final Report to the Commission of the European Communities. WRc Report No EEC 2600-M.

(4) Crossland N. O. (1985). A method to evaluate effects of toxic chemicals on fish growth. Chemosphere, 14, p. 1855-1870.

(5) Nagel R., Bresh H., Caspers N., Hansen P. D., Market M, Munk R., Scholz N. and Höfte B. B. (1991). Effect of 3,4--dichloroaniline on the early life stages of the Zebrafish *(Brachydanio rerio):* results of a comparative laboratory study. Ecotox. Environ. Safety, 21, p. 15 7-164.

(6) Yamamoto, Tokio. (1975). Series of stock cultures in biological field. Medaka (killifish) biology and strains. Keigaku Publish. Tokio, Japan.

(7) Holcombe, G. W., Benoit D. A., Hammermeister, D. E., Leonard, E. N. and Johnson, R. D. (1995). Acute and long-term effects of nine chemicals on the Japanese medaka *(Oryzias latipes).* Arch. Environ. Conta. Toxicol. 28, p. 287-297.

(8) Benoit, D. A., Holcombe, G. W. and Spehar, R. L. (1991). Guidelines for conducting early life toxicity tests with Japanese medaka *(Oryzias latipes).* Ecological Research Series EPA-600/3-91-063. US Environmental Protection Agency, Duluth, Minnesota.

(9) Stephan C. E. and Rogers J. W. (1985). Advantages of using regression analysis to calculate results of chronic toxicity tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Eighth Symposium, ASTM STP 891, R. C. Bahner and D. J. Hansen, eds., American Society for Testing and Materials, Philadelphia, p. 328-338.

(10) Environment Canada (1992). Biological test method: toxicity tests using early life stages of salmonid fish (rainbow trout, coho salmon, or atlantic salmon). Conservation and Protection, Ontario, Report EPS l/RM/28, 81 p.

(11) Cox D. R. (1958). Planning of experiments. Wiley Edt.

(12) Pack S. (1991). Statistical issues concerning the design of tests for determining the effects of chemicals on the growth rate of fish. Room Document 4, OECD Ad Hoc Meeting of Experts on Aquatic Toxicology, WRc Medmenham, UK, 10-12 December 1991.

(13) Dunnett C. W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control, J. Amer. Statist. Assoc, 50, p. 1096-1121.

▼B

(14) Dunnett C. W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, p. 482-491.

(15) Williams D. A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics, 27, p. 103-117.

(16) Johnston, W. L., Atkinson, J. I.., Glanville N. T. (1994). A technique using sequential feedings of different coloured food to determine food intake by individual rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: effect of feeding level. Aquaculture 120, p. 123-133.

(17) Quinton, J. C. and Blake, R. W. (1990). The effect of feed cycling and ration level on the compensatory growth response in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Journal of Fish Biology, 37, p. 33-41.

(18) Post, G. (1987). Nutrition and Nutritional Diseases of Fish. Chapter IX in Testbook of Fish Health. T.F.H. Publications, Inc. Neptune City, New Jersey, USA, 288 pp.

(19) Bruce, R. D. and Versteeg D. J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environ. Toxicol. Chem. 11, pp. 1485-1494.

(20) DeGraeve, G. M., Cooney, J. M., Pollock, T. L, Reichenbach, J. H., Dean, Marcus, M. D. and McIntyre, D. O. (1989). Precision of EPA seven-day fathead minnow larval survival and growth test; intra and interlaboratory study. Report EA-6189 (American Petroleum Institute Publication, No 4468). Electric Power Research Institute, Palo Alto, CA.

(21) Norbert-King T. J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: the ICp approach. US Environmental Protection Agency. Environmental Research Lab., Duluth, Minnesota. Tech. Rep. No 05-88 of National Effluent Toxicity Assesment Center. Sept. 1988. 12 pp.

(22) Williams D. A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, p. 510-531.

▼B

Apêndice 1

ESPÉCIES DE PEIXES RECOMENDADAS PARA ENSAIO E CONDIÇÕES DE ENSAIO APROPRIADAS

Espécie	Gama de temperaturas recomendada (°C)	Fotoperíodo (horas)	Gama de pesos iniciais dos peixes recomendada (g)	Precisão de medição exigida	Taxa de carga (g/l)	Densidade de ocupação (por litro)	Alimentação	Duração do ensaio (dias)
Espécie recomendada:								
Oncorhynchus mykiss Truta arco-íris	12,5-16,0	12-16	1-5	100 mg	1,2-2,0	4	Alimento seco (comercial), preparado a partir de salmonídeos jovens	≥ 28
Outras espécies sobre as quais existe documentação:								
Danio rerio Peixe-zebra	21-25	12-16	0,050-0,100	1 mg	0,2-1,0	5-10	Alimento vivo (*Brachionus, Artemia*)	≥ 28
Oryzias latipes Peixinho dos arrozais	21-25	12-16	0,050-0,100	1 mg	0,2-1,0	5-20	Alimento vivo (*Brachionus, Artemia*)	≥ 28

▼B

Apêndice 2

ALGUMAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DE UMA ÁGUA DE DILUIÇÃO ACEITÁVEL

Substância	Concentrações
Partículas	< 20 mg/l
Carbono orgânico total	< 2 mg/l
Amónia não ionizada	< 1 µg/l
Cloro residual	< 10 µg/l
Total de pesticidas organofosforados	< 50 ng/1
Total de pesticidas organoclorados + bifenilos policlorados	< 50 ng/1
Cloro orgânico total	< 25 ng/1

▼B

Apêndice 3

Séries logarítmicas de concentrações apropriadas para ensaio de toxicidade (9)

Coluna (número de concentrações entre 100 e 10 ou entre 10 e 1) (*)						
1	2	3	4	5	6	7
100	100	100	100	100	100	100
32	46	56	63	68	72	75
10	22	32	40	46	52	56
3,2	10	18	25	32	37	42
1,0	4,6	10	16	22	27	32
	2,2	5,6	10	15	19	24
	1,0	3,2	6,3	10	14	18
		1,8	4,0	6,8	10	13
		1,0	2,5	4,6	7,2	10
			1,6	3,2	5,2	7,5
			1,0	2,2	3,7	5,6
				1,5	2,7	4,2
				1,0	1,9	3,2
					1,4	2,4
					1,0	1,8
						1,3
						1,0

(*) Pode escolher-se uma série de cinco (ou mais) concentrações sucessivas de uma coluna. Os pontos intermédios entre as concentrações de uma coluna (x) encontram-se na coluna (2x + 1). Os valores listados podem representar concentrações expressas em percentagem por volume ou peso (mg/l ou µg/l). Os valores podem ser multiplicados ou divididos por qualquer potência de 10, conforme seja apropriado. Caso exista uma incerteza considerável relativamente ao nível de toxicidade, pode usar-se a coluna 1.

▼B

C.15. ENSAIO DE TOXICIDADE DE CURTO PRAZO NOS PEIXES EM ESTÁDIO EMBRIONÁRIO E RECÉM-NASCIDOS

1. MÉTODO

O presente método de ensaio de toxicidade de curto prazo baseia-se na publicação OECD TG 212 (1998) (normas de ensaio da OCDE).

1.1. INTRODUÇÃO

O presente ensaio de toxicidade a curto prazo nos peixes em estádio embrionário e recém-nascidos é um ensaio de curto prazo, em que se testa a exposição em todas as fases do ciclo de vida desde o ovo recém-fertilizado até ao fim da fase de recém-nascido. Uma vez que, neste ensaio, não é fornecido qualquer alimento aos embriões e peixes recém-nascidos, o ensaio deve ser finalizado enquanto os peixes recém-nascidos ainda se alimentam a partir do saco vitelino.

Este ensaio destina-se a definir os efeitos letais e, até certo ponto, subletais de determinados produtos químicos nos estádios e espécies ensaiados. A informação obtida será útil na medida em que permite a) estabelecer uma ligação entre os ensaios letais e subletais; b) ser utilizado como um ensaio de despiste tanto para um ensaio relativo às primeiras fases de vida como para ensaios de toxicidade crónica; e c) ser utilizado para ensaios em espécies para as quais as técnicas de criação não estejam suficientemente avançadas de modo a abrangerem o período de mudança da alimentação endógena para a exógena.

Importa ter presente que, de um modo geral, só os ensaios que abrangem todos os estádios do ciclo de vida dos peixes são susceptíveis de proporcionar uma estimativa exacta da toxicidade crónica dos produtos químicos para estes animais e que a redução da exposição em qualquer estádio pode reduzir a sensibilidade e, por conseguinte, subestimar a toxicidade crónica. É então de esperar que os ensaios em embriões e peixes recém-nascidos sejam menos sensíveis que um ensaio que englobe todas as fases iniciais de vida, particularmente no respeitante a produtos químicos com elevada lipofilicidade (log P_{ow} > 4) e produtos químicos com um mecanismo específico de acção tóxica. No entanto, para produtos químicos com um mecanismo de acção narcótico não específico, esperam-se menores diferenças entre os dois ensaios em termos de sensibilidade (1).

Antes da publicação deste ensaio, a maior parte das experiências com embriões e peixes recém-nascidos foram realizadas com o peixe de água doce *Danio rerio* Hamilton-Buchanan *(Teleostei, Cyprinidae;* nome comum peixe-zebra). Por esta razão, é fornecida no apêndice 1 uma orientação mais pormenorizada sobre o ensaio com esta espécie, o que não exclui a utilização de outras espécies ensaiadas e relativamente às quais existem obras de referência (quadros 1A e 1B).

1.2. DEFINIÇÕES

Menor concentração com efeito observável (LOEC): é a menor concentração de ensaio da substância a ensaiar para a qual se observa um efeito significativo (a $p < 0,05$) quando comparado com o controlo. No entanto, todas as concentrações de ensaio superiores à LOEC devem ter um efeito prejudicial igual ou superior ao verificado com a NOEC.

Concentração sem efeito observável (NOEC): é a concentração de ensaio cujo valor se situa imediatamente abaixo do valor da LOEC.

▼B

1.3. PRINCÍPIO DO ENSAIO

Os peixes em estádio embrionário e recém-nascidos são expostos a uma gama de concentrações da substância de ensaio dissolvida em água. No âmbito do protocolo, é possível escolher entre um método semi-estático e um método por escoamento. A escolha depende da natureza da substância de ensaio. O ensaio inicia-se colocando ovos fertilizados nas câmaras de ensaio e termina imediatamente antes de o saco vitelino de qualquer larva em qualquer das câmaras de ensaio ter sido completamente absorvido ou antes de ocorrer mortalidade nos controlos por falta de alimento. Os efeitos letais e subletais são avaliados e comparados com os valores de controlo de modo a determinar a menor concentração com efeito observável e, a partir daí, a concentração sem efeito observável. Em alternativa, podem ser analisados utilizando um modelo de regressão para estimar a concentração que provocaria uma dada percentagem de efeito (isto é a CL/CE_X, em que x é uma % de efeito definido).

1.4. INFORMAÇÃO SOBRE A SUBSTÂNCIA DE ENSAIO

Deverão estar disponíveis resultados de um ensaio de toxicidade aguda (ver método C.1) realizado de preferência com a espécie escolhida para este ensaio. Os resultados podem ser úteis para a selecção de uma gama apropriada das concentrações a testar no ensaio sobre as fases iniciais de vida. A solubilidade em água (incluindo a solubilidade na água do ensaio) e a pressão de vapor da substância de ensaio devem ser conhecidas. Deve ser possível utilizar um método analítico fiável para a quantificação da substância nas soluções a ensaiar, relativamente ao qual a exactidão e o limite de detecção sejam conhecidos e se encontrem descritos.

A fórmula estrutural da substância de ensaio, o seu grau de pureza, estabilidade à luz, estabilidade nas condições do ensaio, pKa, P_{ow} e os resultados de um ensaio para a biodegradabilidade «fácil» são informações úteis para o planeamento do ensaio (ver método C.4).

1.5. VALIDADE DO ENSAIO

Um ensaio é considerado válido quando são cumpridas as seguintes condições:

— o número total de ovos fertilizados vivos no grupo de controlo e, quando aplicável, nos recipientes-controlo para o solvente, deve ser igual ou superior aos limites definidos nos apêndices 2 e 3,

— a concentração do oxigénio dissolvido deve situar-se entre 60 e 100 % do valor da saturação com o ar (VSA) ao longo de todo o ensaio,

— a temperatura da água não deve variar mais do que ± 1,5°C entre as diferentes câmaras de ensaio ou entre dias sucessivos, em qualquer momento do ensaio, devendo ainda situar-se na gama de temperaturas especificada para as espécies a ensaiar (apêndices 2 e 3).

▼B

1.6. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.6.1. **Câmaras de ensaio**

Podem ser utilizados quaisquer recipientes de vidro ou outros recipientes em material quimicamente inerte. A dimensão dos recipientes deve ser suficiente para permitir cumprir os requisitos relativos à carga (ver ponto 1.7.1.2). Recomenda-se que as câmaras de ensaio sejam posicionadas de forma aleatória na área de ensaio. Quando em presença de efeitos sistemáticos no laboratório que possam ser controlados mediante a disposição por agrupamento, é preferível aplicar um esquema aleatório de disposição por agrupamento, com cada tratamento está presente em cada grupo, do que um esquema totalmente aleatório. A disposição das câmaras de ensaio por agrupamento, se utilizada, deve ser tomada em consideração na posterior análise de dados. As câmaras de ensaio devem estar protegidas contra perturbações indesejáveis.

1.6.2. **Selecção das espécies de peixes**

As espécies de peixes recomendadas encontram-se indicadas no quadro 1A. Poderão ser utilizadas outras espécies (exemplos no quadro 1B), mas o método de ensaio poderá ter de ser adaptado de modo a proporcionar condições de ensaio adequadas. Neste caso, o critério para a selecção das espécies e o método experimental deverão ser indicados no relatório.

1.6.3. **Confinação da descendência dos peixes**

Poderão ser encontradas indicações úteis sobre a confinação dos alevins em condições adequadas no OECD TG 210 ([1]) e nas referências bibliográficas (2), (3), (4), (5) e (6).

1.6.4. **Manuseamento de embriões e larvas**

Dentro do recipiente principal, os embriões e as larvas podem ser colocados em recipientes menores com as partes laterais ou extremidades em rede, de modo a permitir um fluxo da solução de ensaio através do recipiente. Uma forma de provocar o fluxo, sem turbulência, consiste em pendurar estes pequenos recipientes num «braço» que se movimente para cima e para baixo, desde que os organismos sejam mantidos sempre submersos. Poderá também utilizar-se um sistema de fluxo por efeito de sifão. Os ovos fertilizados de peixes salmonídeos podem ser colocados em suportes ou redes com orifícios suficientemente largos para permitir que as larvas saiam após a eclosão. Nos ensaios semi-estáticos com renovação diária total, a remoção dos embriões e das larvas poderá ser feita de forma apropriada utilizando pipetas Pasteur (ver ponto 1.6.6).

Quando se utilizam recipientes de ovos, grades ou redes para confinar os ovos no recipiente principal de ensaio, estas vedações devem ser removidas após a eclosão ([1]) das larvas, com excepção das redes, que devem ser mantidas para evitar que os peixes escapem. Se houver necessidade de transferir as larvas, estas não devem ser expostas ao ar e não se devem utilizar redes para soltar os peixes dos recipientes de ovos (tal precaução pode não ser necessária para algumas espécies menos frágeis, como a carpa, por exemplo). O momento adequado para efectuar esta transferência varia em função das espécies utilizadas, havendo casos em que a transferência poderá não ser necessária. Para o método semi-estático, podem ser utilizados copos ou recipientes pouco fundos e, se necessário, equipados com uma peneira de rede ligeiramente elevada acima do fundo do copo. Se o volume destes recipientes for suficiente para obedecer aos requisitos de carga, poderá não ser necessário efectuar a transferência de embriões ou larvas (ver ponto 1.7.1.2).

([1]) OECD, Paris, 1992. Test Guideline 210, «Fish, Early-life Stage Toxicity Test».

▼B

1.6.5. **Água**

Qualquer água é adequada como água de ensaio, desde que esteja em conformidade com as características químicas de uma água de diluição aceitável, como indicado no apêndice 4, e desde que a taxa de sobrevivência das espécies a ensaiar seja, nos controlos, pelo menos tão satisfatória como a descrita nos apêndices 2 e 3. A qualidade de água deve ser mantida constante durante o decorrer do ensaio. A variação do valor de pH não deverá ser superior a ± 0,5 unidades. De modo a assegurar que a água de diluição não influencie indevidamente o resultado do ensaio (por complexação da substância de ensaio, por exemplo) ou afecte de forma desfavorável o desempenho do lote de descendentes, deverão ser retiradas amostras regularmente para análise. Devem efectuar-se medições de metais pesados (por exemplo Cu, Pb, Zn, Hg, Cd e Ni), aniões e catiões principais (por exemplo Ca, Mg, Na, K, Cl e SO_4), pesticidas (por exemplo pesticidas organofosforados totais e organoclorados totais), carbono orgânico total e sólidos em suspensão, por exemplo, de três em três meses nos casos em que se sabe que a água de diluição mantém uma qualidade relativamente constante. Se se demonstrar que a qualidade da água se mantém inalterada durante, pelo menos, um ano, as determinações podem ser menos frequentes (de seis em seis meses, por exemplo).

1.6.6. **Soluções de ensaio**

As soluções de ensaio com as concentrações escolhidas são preparadas por diluição da solução de reserva.

A solução de reserva deve ser preparada, preferencialmente, apenas por mistura ou agitação da substância de ensaio na água de diluição, utilizando meios mecânicos (agitação e dispersão ultra-sónica, por exemplo). Podem ser utilizadas colunas de saturação (colunas de solubilidade) para obter uma solução de reserva concentrada adequada. Deve evitar-se, tanto quanto possível, a utilização de solventes ou dispersantes (agentes solubilizantes). No entanto, tais compostos podem ser necessários, em alguns casos, para produzir uma solução de reserva com a concentração adequada. A acetona, o etanol, o metanol, a dimetilformamida e o trietilenoglicol são exemplos de solventes adequados. Dispersantes adequados são, por exemplo, o Cremofor RH40, o Tween 80, a metilcelulose 0,01 % e o HCO-40. Deve ter-se cuidado ao utilizar agentes facilmente biodegradáveis (como a acetona, por exemplo) e/ou altamente voláteis, uma vez que estes podem causar problemas com o desenvolvimento de bactérias nos ensaios em que for utilizado o método de escoamento. Quando se utiliza um agente solubilizante, este não deve ter um efeito significativo na sobrevivência, nem um efeito adverso observável nas fases iniciais de vida, de acordo com o controlo em presença apenas do solvente. No entanto, como se referiu acima, devem fazer-se todos os esforços para evitar utilizar tais produtos.

Para o método semi-estático, podem seguir-se dois procedimentos de renovação diferentes: i) podem preparar-se novas soluções de ensaio em recipientes limpos e transferir suavemente os ovos e larvas sobreviventes para estes recipientes, num pequeno volume da solução velha e evitando a exposição ao ar, ou ii) podem manter-se os organismos a ensaiar nos recipientes enquanto uma proporção da água de ensaio (pelo menos três quartos) é mudada. A frequência de renovação do meio dependerá da estabilidade da substância de ensaio, mas recomenda-se uma renovação diária da água. Se, a partir de ensaios de estabilidade preliminares (ver ponto 1.4), se demonstrar que a concentração da substância de ensaio não é estável (isto é, se estiver fora da gama de 80-120 % do valor nominal ou for inferior a 80 % da concentração medida inicialmente) durante o período de renovação, deve considerar-se a utilização de um ensaio por escoamento. Em qualquer dos casos, deve ter-se cuidado para evitar a perturbação das larvas durante a operação de renovação da água.

▼B

Para os ensaios por escoamento, é necessário utilizar um sistema que distribua e dilua continuamente a solução de reserva da substância de ensaio (uma bomba de medição, um diluidor proporcional, um sistema saturador, por exemplo), por forma a fornecer uma série de concentrações às câmaras de ensaio. As taxas de fluxo das soluções de reserva e da água de diluição devem ser verificadas a intervalos regulares, de preferência diariamente, e não devem variar mais do que 10 % ao longo do ensaio. Considera-se adequada uma taxa de fluxo equivalente a, pelo menos, o volume de cinco câmaras de ensaio em 24 horas (2).

1.7. PROCEDIMENTO

Existem trabalhos publicados que contêm informações úteis sobre a realização de ensaios de toxicidade em embriões de peixe e peixes recém-nascidos, dos quais alguns são indicados na bibliografia apresentada no final (7), (8) e (9).

1.7.1. **Condições de exposição**

1.7.1.1. *Duração*

O ensaio deve iniciar-se de preferência 30 minutos após a fertilização dos ovos. Os embriões são imersos na solução de ensaio antes ou o mais cedo possível depois do início da fase de segmentação discoidal mas, de qualquer forma, sempre antes do início da fase de gástrula. Nos casos em que os ovos utilizados forem obtidos através de um fornecedor comercial, poderá não ser possível iniciar o ensaio imediatamente após a fertilização. O ensaio deve iniciar-se nas oito horas subsequentes à fertilização, porque qualquer atraso pode influenciar significativamente a sensibilidade. Uma vez que as larvas não são alimentadas durante o período de exposição, o ensaio deve terminar imediatamente antes que o saco vitelino de qualquer larva em qualquer das câmaras de ensaio tenha sido completamente absorvido ou antes que se registe mortalidade por falta de alimento. O tempo de exposição dependerá da espécie utilizada. Nos apêndices 2 e 3, apresentam-se algumas recomendações relativas ao período de exposição.

1.7.1.2. *Carga*

O número de ovos fertilizados no início do ensaio deverá ser suficiente para permitir o cumprimento dos requisitos estatísticos. Os ovos devem ser distribuídos aleatoriamente pelos grupos de tratamento e, pelo menos. 30 ovos fertilizados deverão ser repartidos de forma equitativa (ou da forma mais equitativa possível, uma vez que é difícil obter lotes iguais quando se utilizam algumas espécies) pelo menos por três câmaras de ensaio (repetições) para cada concentração. A taxa de carga (biomassa por volume de solução de ensaio) deve ser suficientemente pequena para permitir manter uma concentração de oxigénio dissolvido de pelo menos 60 % VSA sem arejamento. Para os ensaios por escoamento, foi recomendada uma taxa de carga que nunca deverá exceder 0,5 g/l em 24 horas, nem 5 g/l de solução (2).

1.7.1.3. *Luz e temperatura*

O fotoperíodo e a temperatura da água do ensaio devem ser apropriados para a espécie a ensaiar (apêndices 2 e 3). Poderá ser apropriado utilizar um recipiente de ensaio adicional para a monitorização da temperatura.

▼B

1.7.2. **Concentrações de ensaio**

Normalmente, deverão ser utilizadas cinco concentrações da substância de ensaio espaçadas por um factor constante não superior a 3,2. Na escolha da gama de concentrações do ensaio, deve considerar-se a curva que relaciona a CL_{50} com o período de exposição no estudo de toxicidade aguda. Nalgumas circunstâncias, poderá ser apropriado utilizar menos de cinco concentrações (em testes-limite, por exemplo) e um intervalo de concentração mais estreito. Deve fornecer-se uma justificação quando se utilizam menos de cinco concentrações. As concentrações da substância superiores ao valor CL_{50} após 96 horas ou a 100 mg/l (a mais reduzida das duas), não necessitam de ser ensaiadas. As substâncias não devem ser ensaiadas acima do seu limite de solubilidade na água de ensaio.

Quando se utiliza um agente solubilizante para facilitar a preparação de soluções de ensaio (ver ponto 1.6.6), a sua concentração final nos recipientes de ensaio não deve ser superior a 0,1 ml/l e deve ser a mesma em todos os recipientes de ensaio.

1.7.3. **Controlos**

Além dos ensaios principais, devem ser utilizados um controlo da água destilada (com as repetições apropriadas) e, se relevante, um controlo contendo o agente solubilizante (com as repetições apropriadas).

1.7.4. **Frequência das determinações analíticas e medições**

Durante o ensaio, as concentrações da substância de ensaio deverão ser determinadas a intervalos regulares.

No ensaio semi-estático, em que se espera que a concentração da substância de ensaio se mantenha dentro de um intervalo de ± 20 % do valor nominal (isto é, dentro da gama 80-120 %; ver ponto 1.4 e 1.6.6), recomenda-se que, no mínimo, a maior e a menor concentrações de ensaio sejam analisadas quando acabam de ser preparadas e imediatamente antes da renovação em, pelo menos, três ocasiões a intervalos regulares durante o ensaio (isto é as análises devem ser realizadas numa amostra da mesma solução — quando esta acaba de ser preparada e no momento da renovação).

Para os ensaios em que não se espera que a concentração da substância de ensaio se mantenha dentro do intervalo de ± 20 % do valor nominal (com base nos dados de estabilidade da substância), é necessário analisar todas as concentrações de ensaio, logo após a sua preparação e antes da renovação, mas seguindo o mesmo regime (isto é, em pelo menos três ocasiões a intervalos regulares durante o ensaio). A determinação das concentrações da substância de ensaio antes da renovação só necessita de ser realizada numa das repetições para cada concentração de ensaio. O intervalo entre as determinações não deve exceder sete dias. Recomenda-se que os resultados se baseiem em concentrações medidas. No entanto, os resultados podem basear-se em valores nominais ou valores iniciais medidos, se existirem provas de que a concentração da substância a ensaiar na solução se manteve no intervalo de ± 20 % do valor nominal ou do valor da concentração inicial medida durante o ensaio.

Para os ensaios por escoamento, é apropriado um regime de amostragem semelhante ao descrito para os ensaios semi-estáticos (embora a medição das soluções «usadas» não seja aplicável neste caso). No entanto, se o ensaio se prolongar por mais de sete dias, poderá ser aconselhável aumentar o número de amostras analisadas durante a primeira semana (efectuando três conjuntos de medições, por exemplo) de forma a assegurar que as concentrações de ensaio se mantêm estáveis.

▼B

As amostras podem precisar de ser centrifugadas ou filtradas (utilizando um poro com 0,45 μm de tamanho, por exemplo). No entanto, como nem sempre a centrifugação ou a filtração separam a fracção não biodisponível da fracção biodisponível da substância de ensaio, as amostras poderão não ser sujeitas a estes tratamentos.

Durante o ensaio, o oxigénio dissolvido, o pH e a temperatura devem ser medidos em todos os recipientes de ensaio. A dureza total e a salinidade (se relevante) devem ser medidas nos controlos e num recipiente com a concentração mais elevada. O oxigénio dissolvido e a salinidade (se relevante) devem ser medidos, no mínimo, três vezes (no início, a meio e no fim do ensaio). Nos ensaios semi-estáticos, recomenda-se que o oxigénio dissolvido seja medido com maior frequência, de preferência antes e após cada renovação da água ou, pelo menos, uma vez por semana. O pH deve ser medido no início e no fim de cada renovação da água nos ensaios semi-estáticos e, pelo menos, semanalmente nos ensaios por escoamento. A dureza deve ser medida uma vez em cada ensaio. A temperatura deve ser medida diariamente e, de preferência, monitorizada continuamente pelo menos num recipiente de ensaio.

1.7.5. **Observações**

1.7.5.1. *Estádio de desenvolvimento embrionário*

O estádio embrionário (isto é, o estádio de gástrula) no início da exposição à substância de ensaio deve ser verificado de forma tão precisa quanto possível. Poder-se-á utilizar para o efeito uma amostra representativa dos ovos adequadamente conservados e limpos. A bibliografia apresentada no final poderá também ser consultada para a descrição e ilustração dos estádios embrionários (2), (5), (10) e (11).

1.7.5.2. *Eclosão e sobrevivência*

A eclosão e a sobrevivência deverão ser observadas e registadas, pelo menos diariamente. No início do ensaio, poderá ser útil efectuar observações mais frequentes (de 30 em 30 minutos durante as primeiras três horas, por exemplo), uma vez que, em alguns casos, o período de sobrevivência pode ser mais relevante do que apenas o número de mortes (quando existem efeitos tóxicos agudos, por exemplo). Os embriões e as larvas mortos devem ser retirados logo após a sua observação, uma vez que podem decompor-se rapidamente. A remoção dos indivíduos mortos deverá ser extremamente cuidadosa, de forma a não provocar danos físicos nos ovos/larvas vizinhos, já que estes são extremamente frágeis e sensíveis. Os critérios de morte variam de acordo com o estádio de vida:

— **para os ovos:** particularmente nos estádios iniciais, uma acentuada perda de translucidez e alteração na coloração, causada por coagulação e/ou precipitação de proteína e conduzindo a um aspecto branco opaco,

— **para os embriões:** ausência de movimento e/ou ausência de batimentos cardíacos e/ou descoloração opaca nas espécies com embriões normalmente translúcidos,

— **para as larvas:** imobilidade e/ou ausência de movimentos respiratórios e/ou ausência de batimentos cardíacos e/ou coloração branca opaca do sistema nervoso central e/ou falta de reacção a estímulos mecânicos.

▼B

1.7.5.3. *Aspecto anómalo*

O número de larvas que apresentam uma forma corporal e/ou uma pigmentação anómalos, assim como o estado de absorção do saco vitelino deverão ser registados a intervalos de tempo adequados em função da duração do ensaio e da natureza da anomalia descrita. É importante notar que o aparecimento de embriões e larvas com anomalias é um fenómeno que ocorre naturalmente, podendo nalgumas espécies afectar uma percentagem significativa do(s) controlo(s). Os animais que apresentem um aspecto anómalo só devem ser retirados dos recipientes de ensaio quando estiverem mortos.

1.7.5.4. *Comportamento anómalo*

Anomalias tais como a hiperventilação, as alterações no comportamento natatório e o estado de passividade anormal, deverão ser registadas a intervalos de tempo adequados, em função da duração do ensaio. Embora estes efeitos sejam difíceis de quantificar, a sua observação pode ajudar na interpretação dos dados relativos à mortalidade, isto é, podem fornecer informação sobre o mecanismo de acção tóxica da substância.

1.7.5.5. *Comprimento*

Recomenda-se que, no fim do ensaio, se proceda à medição do comprimento de cada indivíduo. Os comprimentos a medir poderão ser o normalizado, o comprimento até à extremidade da barbatana caudal ou o comprimento total. Se, no entanto, as barbatanas caudais dos peixes apresentarem sinais de apodrecimento ou erosão, o comprimento a medir será o normalizado. Normalmente, num ensaio bem realizado o coeficiente da variação de comprimento entre as repetições dos controlos deve ser $\leq$ 20 %.

1.7.5.6. *Peso*

No fim do ensaio, os indivíduos poderão ser pesados separadamente, sendo preferível o peso seco (24 horas a 60°C) ao peso fresco (seco com papel absorvente). Normalmente, num ensaio bem realizado, o coeficiente de variação de peso entre as repetições dos controlos deve ser $\leq$ 20 %.

A partir destas observações, deverão ser elaborados todos ou parte dos seguintes dados, que serão objecto de análise estatística:

— mortalidade acumulada,

— números de larvas saudáveis no fim do ensaio,

— início e fim do período de eclosão (isto é 90 % de eclosão em cada repetição),

— números de larvas eclodidas por dia,

— comprimento (e peso) dos animais sobreviventes no fim do ensaio,

— números de larvas que apresentam deformações ou um aspecto anómalo,

— números de larvas que apresentam um comportamento anómalo.

▼B

2. **DADOS E RELATÓRIO**

2.1. TRATAMENTO DOS RESULTADOS

Recomenda-se que um técnico estatístico participe tanto no planeamento como na análise do ensaio, uma vez que o método permite variações consideráveis no planeamento experimental no que se refere, por exemplo, ao número de câmaras de ensaio, ao número de concentrações de ensaio, ao número inicial de ovos fertilizados e aos parâmetros medidos. Devido às inúmeras opções disponíveis quanto ao planeamento do ensaio, não se fornece qualquer orientação específica relativamente aos procedimentos estatísticos.

Se se pretender determinar a LOEC/NOEC, será necessário analisar as variações dentro de cada conjunto de repetições, utilizando uma análise de variância (ANOVA) ou procedimentos de tabelas de contingência. O método de Dunnett (12) (13) pode ser útil para efectuar uma comparação múltipla entre os resultados das concentrações individuais e os dos controlos. Existem igualmente outros exemplos úteis (14) (15). A dimensão do efeito detectável utilizando o método ANOVA ou outros procedimentos (isto é a capacidade do ensaio) deverá ser calculada e descrita. Importa salientar que nem todas as observações descritas no ponto 1.7.5.6 são adequadas para a análise estatística utilizando a ANOVA. A mortalidade acumulada e os números de larvas saudáveis no fim do ensaio podem ser analisados utilizando métodos probit, por exemplo.

Se se pretender determinar os valores CL/CE_X, a(s) curva(s) adequada(s), como a curva logística, deve(m) ser ajustada(s) aos dados relevantes utilizando um método estatístico (como o método dos mínimos quadrados ou dos mínimos quadrados não linear). A(s) curva(s) deve(m) ser parametrizada(s) de modo a que os valores CL/CE_X de interesse e o seu desvio-padrão possam ser estimados directamente. Isto facilitará enormemente o cálculo dos limites de confiança em volta dos valores CL/CE_X. A não ser que haja boas razões para preferir limites de confiança diferentes, devem ser utilizados limites de confiança de mais ou menos 95 %. O procedimento de ajuste deve, preferencialmente, permitir avaliar a significância da falta de ajuste. Podem utilizar-se métodos gráficos de ajuste de curvas. A análise de regressão é adequada para todas as observações descritas no ponto 1.7.5.6.

2.2. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados devem ser interpretados com precaução quando as concentrações tóxicas medidas nas soluções de ensaio ocorrem em níveis situados perto do limite de detecção do método analítico. A interpretação dos resultados para concentrações superiores ao limite de solubilidade da substância na água deve igualmente ser efectuada com precaução.

2.3. RELATÓRIO DO ENSAIO

O relatório do ensaio deverá incluir as seguintes informações:

2.3.1. **Substância de ensaio:**

— natureza física e propriedades físico-químicas relevantes,

— dados de identificação química, incluindo o grau de pureza e o método analítico para a quantificação das substâncias de ensaio, quando apropriado.

▼B

2.3.2. **Espécie de ensaio:**

— nome científico, estirpe, número de peixes progenitores (isto é número de fêmeas utilizadas para fornecer o número de ovos necessários ao ensaio), fonte e método de recolha dos ovos fertilizados e posterior manuseamento.

2.3.3. **Condições de ensaio:**

— o procedimento de ensaio utilizado (semi-estático ou por escoamento, período de tempo desde a fertilização até ao início do ensaio, carga, etc.),

— o(s) fotoperíodo(s),

— o planeamento do ensaio (por exemplo, o número de câmaras de ensaio e repetições, o número de embriões por repetição),

— o método de preparação das soluções de reserva e a frequência de renovação (quando utilizados, o agente solubilizante e a sua concentração devem ser indicados),

— os valores nominais das concentrações de ensaio, os valores medidos, as suas médias e os respectivos desvios-padrão nos recipientes de ensaio, o método através do qual estes foram obtidos e, se a substância de ensaio for solúvel na água em concentrações inferiores às ensaiadas, as provas de que as medições se referem às concentrações da substância de ensaio na solução,

— características da água de diluição: o pH, a dureza, a temperatura, a concentração do oxigénio dissolvido, os níveis de cloro residual (caso tenham sido medidos), o carbono orgânico total, os sólidos em suspensão, a salinidade do meio de ensaio (caso tenha sido medida) e quaisquer outras medições efectuadas,

— a qualidade da água dentro dos recipientes de ensaio: o pH, a dureza, a temperatura e a concentração do oxigénio dissolvido.

2.3.4. **Resultados:**

— resultados de qualquer estudo preliminar sobre a estabilidade da substância de ensaio,

— prova de que os controlos estão de acordo com o padrão de aceitação de sobrevivência total da espécie de ensaio (apêndices 2 e 3),

— dados sobre a mortalidade/sobrevivência nos estádios embrionário e larvar e sobre a mortalidade/sobrevivência total,

— dias até à eclosão e número de eclosões,

— dados sobre o comprimento (e peso),

— incidência e descrição de anomalias morfológicas, caso tenham sido observadas,

— incidência e descrição de efeitos comportamentais, caso tenham sido observados,

— análise estatística e tratamento de dados,

— para ensaios analisados utilizando o método ANOVA, a menor concentração com efeito observável (LOEC) a $p = 0,05$ e a concentração sem efeito observável (NOEC) para cada resposta avaliada, incluindo uma descrição dos procedimentos estatísticos utilizados e uma indicação da dimensão do efeito que pode ser detectado,

▼B

— para os ensaios analisados utilizando técnicas de regressão, a CL/CE_X e os intervalos de confiança, bem como o gráfico do modelo ajustado utilizado para o seu cálculo,

— explicação dos motivos para qualquer desvio a este método de ensaio.

3. **REFERÊNCIAS**

(1) Kristensen P. (1990). Evaluation of the Sensitivity of Short Term Fish Early Life Stage Tests in Relation to other FELS Test Methods. Final report to the Commission of the European Communities, 60 p. June 1990.

(2) ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes. American Society for Testing and Materials. E 1241-88. 26 p.

(3) Brauhn J. L. and Schoettger R. A. (1975). Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel Catfish and Bluegills. p. 54, Ecological Research Series, EPA-660/3-75-O11, Duluth, Minnesota.

(4) Brungs W. A. and Jones B. R. (1977). Temperature Criteria for Freshwater Fish: Protocol and Procedures. p. 128, Ecological Research Series EPA-600/3-77-061, Duluth, Minnesota.

(5) Laale H. W. (1977). The Biology and Use of the Zebrafish *(Brachydanio rerio)* in Fisheries Research. A Literature Review. J. Biol. 10, p. 121-173.

(6) Legault R. (1958). A Technique for Controlling the Time of Daily Spawning and Collecting Eggs of the Zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) Copeia, 4, p. 328-330.

(7) Dave G., Damgaard B., Grande M., Martelin J. E., Rosander B. and Viktor T. (1987). Ring Test of an Embryo-larval Toxicity Test with Zebrafish *(Brachydanio rerio)* Using Chromium and Zinc as Toxicants. Environmental Toxicology and Chemistry, 6, p. 61-71.

(8) Birge J. W., Black J. A. and Westerman A. G. (1985). Short-term Fish and Amphibian Embryo-larval Tests for Determining the Effects of Toxicant Stress on Early Life Stages and Estimating Chronic Values for Single Compounds and Complex Effluents. Environmental Toxicology and Chemistry 4, p. 807-821.

(9) Van Leeuwen C. J., Espeldoorn A. and Mol F. (1986). Aquatic Toxicological Aspects of Dithiocarbamates and Relatcd Compounds. III. Embryolarval Studies with Rainbow Trout (*Salmo gairdneri).* J. Aquatic Toxicology, 9, p. 129-145.

(10) Kirchen R. V. and W. R. West (1969). Teleostean Development. Carolina Tips 32(4): 1-4. Carolina Biological Supply Company.

(11) Kirchen R. V. and W. R. West (1976). The Japanese Medaka. Its care and Development. Carolina Biological Supply Company, North Carolina. 36 p.

(12) Dunnett C. W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with Control. J. Amer. Statist. Assoe, 50, p. 1096-1121.

(13) Dunnett C. W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, p. 482-491.

(14) Mc Clave J. T., Sullivan J. H. and Pearson J.G. (1980). Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data. Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Philadelphia.

▼B

(15) Van Leeuwen C. J., Aderna D. M. M. and Hermes J. (1990). Quantitative Structure-Activity Relationships for Fish Early Life Stage Toxicity. Aquatic Toxicology, 16, p. 321-334.

(16) Environment Canada. (1992). Toxicity Tests Using Early Life Stages of Salmonid Fish (Rainbow Trout, Coho Salmon or Atlantic Salmon). Biological Test Method Series. Report EPS 1/RM/28, December 1992, 81 p.

(17) Dave G. and Xiu R. (1991). Toxicity of Mercury, Nickel, Lead and Cobalt to Embryos and Larvae of Zebrafish, *Brachydanio rerio*. Arch. of Environmental Contamination and Toxicology, 21, p. 126-134.

(18) Meyer A., Bierman C. H. and Orti G. (1993). The phylogenetic position of the Zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology — an invitation to the comparative methods. Proc. Royal Society of London, Series B, 252, p. 231-236.

(19) Ghillebaert F., Chaillou C., Deschamps F. and Roubaud P. (1995). Toxic Effects, at Three pH Levels, of Two Reference Molecules on Common Carp Embryo. Ecotoxicology and Environmental Safety 32, p. 19-28.

(20) US EPA, (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. EPA report EPA/600/3-91/064, Dec. 1991, EPA, Duluth.

(21) US EPA, (1991). Guidelines for Conducting Early Life Stage Toxicity Tests with Japanese Medaka, *(Oryzias latipes)*. EPA report EPA/600/3-91/063, Dec. 1991, EPA, Duluth.

(22) De Graeve G. M., Cooney J. D., McIntyre D. O., Poccocic T. L., Reichenbach N. G., Dean J. H. and Marcus M. D. (1991). Validity in the performance of the seven-day Fathead minnow *(Pimephaless promelas)* larval survival and growth test: an intra- and interlaboratory study. Environ. Tox. Chem. 10, p. 1189-1203.

(23) Calow P. (1993). Handbook of Ecotoxicology, Blackwells, Oxford. Vol. 1, Chapter 10: Methods for spawning, culturing and conducting toxicity tests with Early Life stages of Estuarine and Marine fish.

(24) Balon E. K. (1985). Early life history of fishes: New developmental, ecological and evolutionary perspectives, Junk Publ., Dordrecht, 280 p.

(25) Blaxter J. H. S. (1988). Pattern and variety in development, in: W. S. Hoar and D. J. Randall eds., Fish Physiology, Vol. XIA, Academic press, p. 1-58.

Quadro 1A

Espécies de peixes recomendadas para os ensaios

Água doce
Oncorhynchus mykiss Truta arco-íris (9) (16)
Danio rerio Peixe-zebra (7) (17) (18)
Cyprinus caprio Carpa (8) (19)
Oryzias latipes Peixinho dos arrozais (20) (21)
Pimephales promelas (8) (22)

▼B

Quadro 1B

Exemplos de outras espécies que também já foram utilizadas e sobre as quais existe documentação

Água doce	Água salgada
Carassius auratus Pimpão (8)	*Menidia peninsulae* (23) (24) (25)
Lepomis macrochirus (8)	*Clupea harengus* Arenque (24) (2 5)
	Gadus morhua Bacalhau (24) (25)
	Cyprinodon variegatus (23) (24) (25)

▼B

Apêndice 1

ORIENTAÇÃO SOBRE A REALIZAÇÃO DE UM ENSAIO DE TOXICIDADE EM EMBRIÕES E RECÉM-NASCIDOS DE PEIXE-ZEBRA (*BRACHYDANIO RERIO*)

INTRODUÇÃO

O peixe-zebra é originário da costa Coromandel, na Índia, onde habita em riachos de correntes rápidas. É um peixe vulgar de aquário da família das carpas, sendo possível encontrar informação acerca dos procedimentos relativos ao seu tratamento e cultura em livros de referência sobre peixes tropicais. A sua biologia e utilização na investigação piscícola foram revistas por Laale (1).

O peixe raramente excede os 45 mm em comprimento. O corpo é cilíndrico com sete a nove riscas horizontais azul-escuro prateadas. Estas riscas prolongam-se pelas barbatanas ventrais e caudais. A região posterior é verde azeitona. Os machos são mais magros do que as fêmeas. As fêmeas são mais prateadas e o seu abdómen apresenta uma forma dilatada, particularmente antes da desova.

Os peixes adultos toleram grandes variações de temperatura, pH e dureza. No entanto, devem ser criadas condições óptimas para obter peixes saudáveis que produzam ovos de boa qualidade.

Durante a desova o macho persegue e atinge a fêmea, sendo os ovos fertilizados à medida que vão sendo expelidos. Os ovos, que são transparentes e não aderentes, caem para o fundo onde podem ser comidos pelos progenitores. A desova é influenciada pela luz. Se a luz da manhã for adequada, o peixe geralmente desova nas primeiras horas a seguir ao amanhecer.

Uma fêmea pode produzir semanalmente lotes de várias centenas de ovos.

CONDIÇÕES PARA OS PEIXES PROGENITORES, A REPRODUÇÃO E AS FASES INICIAIS DE VIDA

Seleccionar um número adequado de peixes saudáveis e mantê-los numa água adequada (nas condições descritas no apêndice 4, por exemplo) durante, pelo menos, duas semanas antes da desova pretendida. Deve permitir-se que o grupo de peixes se reproduza pelo menos uma vez antes de produzir o lote de ovos utilizados no ensaio. A densidade dos peixes durante este período não deve exceder 1 grama por litro. A mudança regular da água ou a utilização de sistemas de purificação permitirão que a densidade seja mais elevada. A temperatura nos tanques de conservação deve ser mantida a 25 ± 2 °C. Deve fornecer-se aos peixes uma dieta variada, que poderá consistir, por exemplo, em alimentos comerciais secos apropriados, larvas vivas recém-eclodidas, *Artemia, chironomus, Daphnia,* ou *Enchytraeus.*

São indicados em seguida dois procedimentos que, na prática, permitiram obter um lote de ovos fertilizados saudáveis adequado à realização de um ensaio:

i) Colocam-se oito fêmeas e 16 machos num tanque contendo 50 litros de água de diluição, protegidos da luz directa e mantidos, tanto quanto possível, sem perturbações durante pelo menos 48 horas. Na tarde do dia anterior ao início do ensaio, coloca-se um tabuleiro de desova no fundo do aquário. O tabuleiro de desova consiste numa moldura de *plexi-glass* ou outro material adequado com 5 a 7 cm de altura, com uma rede grosseira de malha de 2 a 5 mm presa no topo, e uma rede fina (malha de 10 a 30 μm) no fundo. Prende-se à rede grosseira da estrutura uma série de «árvores de desova», que consistem em pedaços de corda de *nylon* desenrolada. Após o peixe ter permanecido num ambiente sem luz durante 12 horas, acende-se uma luz ténue que provocará o início da desova. Duas a quatro horas após a desova, remove-se o tabuleiro e recolhem-se os ovos. O tabuleiro de desova evitará que o peixe coma os ovos e, ao mesmo tempo, permitirá a sua fácil recolha. O grupo de peixes deverá ter desovado pelo menos uma vez antes da desova que originará os ovos a utilizar no ensaio;

▼B

ii) Cinco a dez peixes machos e fêmeas são mantidos individualmente pelo menos duas semanas antes da desova pretendida. Após cinco a dez dias, o abdómen das fêmeas estará distendido e as suas papilas genitais visíveis. Os machos não têm papila. A desova é realizada em tanques de desova equipados com um fundo falso em rede (como descrito anteriormente). Enche-se o tanque com água de diluição, de modo a que a altura da água acima da rede seja de 5 a 10 cm. Colocam-se uma fêmea e dois machos no tanque um dia antes da desova pretendida. Aumenta-se gradualmente a temperatura da água um grau acima da temperatura de aclimatização. Apaga-se a luz e o tanque é mantido com a mínima perturbação possível. De manhã, acende-se uma luz ténue que irá provocar o início da desova. Após duas a quatro horas, removem-se os peixes e recolhem-se os ovos. Se uma só fêmea não produzir lotes com número suficiente de ovos, podem preparar-se, em paralelo, tantos tanques de desova quantos os necessários. Os registos sobre o nível de reprodução individual das fêmeas antes do ensaio (tamanho do lote e qualidade) poderão servir para seleccionar as fêmeas com maior sucesso reprodutivo.

Os ovos devem ser transferidos para os recipientes de ensaio utilizando tubos de vidro (com um diâmetro interno não inferior a 4 mm) adaptados a uma ampola de sucção flexível. A quantidade de água que acompanha os ovos aquando da sua transferência deverá ser reduzida ao mínimo possível. Os ovos são mais pesados do que a água e afundam-se caindo do tubo. Deve ter-se cuidado para evitar que os ovos (e as larvas) entrem em contacto com o ar. O exame microscópico de amostra(s) do(s) lote(s) deve ser realizado para assegurar que não há irregularidades nos primeiros estádios de desenvolvimento. Não é permitida a desinfecção dos ovos.

A taxa de mortalidade dos ovos é mais elevada durante as primeiras 24 horas após a fertilização, período durante o qual se observa, geralmente, uma taxa de mortalidade de 5 a 40 %. por cento. Os ovos degeneram em consequência do insucesso da fertilização ou de alteração no desenvolvimento. A qualidade do lote de ovos parece depender do peixe fêmea, uma vez que algumas fêmeas produzem consistentemente ovos de boa qualidade, enquanto que outras nunca o fazem. As taxas de desenvolvimento e de eclosão variam igualmente de lote para lote. Os ovos fertilizados com sucesso e as larvas com saco vitelino sobrevivem bem, normalmente com taxas acima dos 90 %. A 25 ^{o}C, os ovos eclodirão três a cinco dias após a fertilização e o saco vitelino será absorvido cerca de 13 dias após a fertilização.

O desenvolvimento embrionário foi descrito de forma muito completa por Hisaoka e Battle (2). Devido à transparência dos ovos e das larvas pós-eclosão, o desenvolvimento dos peixes pode ser seguido e a presença de malformações observada. Aproximadamente quatro horas após a desova, é possível distinguir os ovos fertilizados dos não fertilizados (3). Para efectuar este exame, os ovos e as larvas são colocados em recipientes de ensaio de pequeno volume e estudados ao microscópio.

As condições de ensaio aplicáveis às fases iniciais de vida encontram-se descritas no apêndice 2. Os valores óptimos para o pH e a dureza da água de diluição são, respectivamente, 7,8 e 250 mg $CaCO_3$/l.

CÁLCULOS E ESTATÍSTICA

Propõe-se uma abordagem em duas fases. Primeiro, são analisados estatisticamente os dados sobre a mortalidade, o desenvolvimento anómalo e o tempo de eclosão. Depois, para as concentrações em que não se detectaram efeitos adversos em quaisquer destes parâmetros, avalia-se estatisticamente o comprimento do corpo. Aconselha-se esta abordagem, uma vez que o produto tóxico pode matar selectivamente peixes menores, atrasar o tempo de eclosão e induzir malformações graves, conduzindo assim a desvios às medições de comprimento. Além disso, existirão aproximadamente o mesmo número de peixes a medir por tratamento, o que garante a validade da estatística do ensaio.

▼B

DETERMINAÇÃO DA CL_{50} E DA CE_{50}

A percentagem de ovos e de larvas sobreviventes é calculada e corrigida para a mortalidade nos controlos, de acordo com a fórmula de Abbott (4):

$$P = 100 - \left(\frac{C - P'}{C} \times 100\right)$$

em que

P = % sobrevivência corrigida

P' = % sobrevivência observada com a concentração de ensaio

C = % sobrevivência no controlo

Se possível, a CL_{50} deve ser determinada através de um método adequado no fim do ensaio.

Se for desejável incluir as anomalias morfológicas na estatística de CE_{50}, o trabalho de Stephan (5) poderá fornecer orientações úteis.

ESTIMATIVAS DA LOEC E NOEC

Um dos objectivos do ensaio em ovos e peixes recém-nascidos é comparar as concentrações diferentes de zero com o controlo, isto é, determinar a LOEC, pelo que deverão ser utilizados os métodos de comparação múltipla indicados nas obras de referência (6) (7) (8) (9) (10).

REFERÊNCIAS

(1) Laale H. W. (1977). The Biology and Use of the Zebrafish *(Brachydanio rerio)* in Fisheries Research. A Literature Review. J. Fish Biol. 10, p. 121-173.

(2) Hisaoka K. K. and Battle H. I. (1958). The Normal Development Stages of the Zebrafish *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) J. Morph., 102, 311 p.

(3) Nagel R. (1986). Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebrabärbling *(Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan). Journal of Applied Ichthyology, 2, p. 173-181.

(4) Finney D. J. (1971). Probit Analysis, 3rd ed., Cambridge University Press, Great Britain, p. 1-333.

(5) Stephan C. E. (1982). Increasing the Usefulness of Acute Toxicity Tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Fifth Conference, ASTM STP 766, J. G. Pearson, R. B. Foster and W. E. Bishop, Eds., American Society for Testing and Materials, p. 69-81.

(6) Dunnett C. W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, p. 1096-1121.

(7) Dunnett C. W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, p. 482-491.

(8) Williams D. A. (1971). A Test for Differences Between Treatment Means when Several Dose Levels are Compared with a Zero Dose Control. Biometrics, 27, p. 103-117.

(9) Williams D. A. (1972). The Comparison of Several Dose Levels with a Zero Dose Control. Biometrics 28, p. 519-531.

(10) Sokal R. R. and Rohlf F. J. (1981). Biometry, the Principles and Practice of Statistics in Biological Research, W. H. Freeman and Co., San Francisco.

Apêndice 2

CONDIÇÕES DE ENSAIO, DURAÇÃO E CRITÉRIO DE SOBREVIVÊNCIA PARA AS ESPÉCIES RECOMENDADAS

Espécie	Temperatura (°C)	Salinidade (0/00)	Fotoperíodo (horas)	Duração dos estádios (dias)		Duração típica do ensaio	Taxa de sobrevivência nos controlos (mínima %)	
				Embriões	Recém-nascidos		Sucesso da eclosão	Pós-eclosão
ÁGUA DOCE								
Brachydanio rerio Pei xe-zebra	25 ± 1	—	12-16	3-5	8-10	Tão cedo quanto possível após a fertilização (estádio de gástrula inicial) até cinco dias após a eclosão (8-10 dias)	80	90
Oncorhynchus mykiss Truta arco-íris	10 ± 1 (1) 12 ± 1 (2)	—	0 (a)	30-35	25-30	Tão cedo quanto possível após a fertilização (estádio de gástrula inicial) até 20 dias após a eclosão (50-55 dias)	66	70
Cyprinus carpio Carpa	21-25	—	12-16	5	> 4	Tão cedo quanto possível após a fertilização (estádio de gástrula inicial) até quatro dias após a eclosão (8-9 dias)	80	75
Oryzias latipes Peixinho dos arrozais	24 ± 1 (1) 23 ± 1 (2)	—	12-16	8-11	4-8	Tão cedo quanto possível após a fertilização (estádio de gástrula inicial) até cinco dias após a eclosão (13-16 dias)	80	80
Pimephales promelas	25 + 2	—	16	4-5	5	Tão cedo quanto possível após a fertilização (estádio de gástrula inicial) até quatro dias após a eclosão (8-9 dias)	60	70

(1) Para embriões.
(2) Para larvas.
(a) Escuridão para o embrião e as larvas até uma semana após a eclosão, excepto quando estes estão a ser inspeccionados. A partir daí, deve utilizar-se luz fraca ao longo do ensaio.

▼B

Apêndice 3

Condições de ensaio, duração e critérios de sobrevivência para outras espécies relativamente às quais existem trabalhos de referência

Espécie	Temperatura (DC)	Salinidade (0/00)	Fotoperíodo (horas)	Duração dos estádios (dias)		Duração típica do ensaio de embriões e recém-nascidos	Taxa de sobrevivência nos controlos (% mínima)	
				Embriões	Ensaio recém-nascidos		Sucesso da eclosão	Pós-eclosão
ÁGUA DOCE								
Carassius auratus Pimpão	24 ± 1	—	—	3-4	> 4	Tão cedo quanto possível após a fertilização (estádio de gástrula inicial) até quatro dias após a eclosão (sete dias)	—	80
Leopomis macrochirus	21 ± 1	—	16	3	> 4	Tão cedo quanto possível após a fertilização (estádio de gástrula inicial) até quatro dias após a eclosão (sete dias)	—	75
ÁGUA SALGADA								
Menidia peninsulae	22-25	15-22	12	1,5	10	Tão cedo quanto possível após a fertilização (estádio de gástrula inicial) até cinco dias após a eclosão (6-7 dias)	80	60
Clupea harengus Arenque	10 ± 1	8-15	12	20-25	3-5	Tão cedo quanto possível após a fertilização (estádio de gástrula inicial) até três dias após a eclosão (23-27 dias)	60	80
Gadus morhua Bacalhau	5 ± 1	5-30	12	14-16	3-5	Tão cedo quanto possível após a fertilização (estádio de gástrula inicial) até três dias após a eclosão (18 dias)	60	80
Cyprinodon variegatus	25 ± 1	15-30	12	—	—	Tão cedo quanto possível após a fertilização (estádio de gástrula inicial) até 4-7 dias após a eclosão (28 dias)	> 75	80

▼B

Apêndisce 4

ALGUMAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DE UMA ÁGUA DE DILUIÇÃO ACEITÁVEL

Substância	Concentrações
Partículas	< 20 mg/l
Carbono orgânico total	< 2 mg/l
Amónia não ionizada	< 1 µg/l
Cloro residual	< 10 µg/l
Total de pesticidas organofosforados	< 50 ng/l
Total de pesticidas organoclorados + bifenis policlorados	< 50 ng/l
Cloro orgânico total	< 25 ng/l

▼B

C.16. ABELHAS DOMÉSTICAS — ENSAIO DE TOXICIDADE ORAL AGUDA

1. MÉTODO

O presente método de ensaio de toxicidade aguda baseia-se na publicação OECD TG 213 (1998) (normas de ensaio da OCDE).

1.1. INTRODUÇÃO

O presente ensaio de toxicidade constitui um método laboratorial destinado a avaliar a toxicidade oral aguda de produtos fitofarmacêuticos e outras substâncias químicas para as abelhas domésticas obreiras adultas.

Os processos de avaliação e verificação das características tóxicas de substâncias podem exigir a determinação da toxicidade oral aguda para as abelhas domésticas. Esta situação verifica-se, por exemplo, quando há uma probabilidade de exposição de abelhas a um produto químico específico. O ensaio de toxicidade oral aguda permite determinar a toxicidade de pesticidas e outras substâncias químicas para as abelhas. Os seus resultados condicionarão a necessidade de efectuar ulteriores avaliações. O método é especialmente adequado para uso em programas passo-a-passo, destinados a avaliar os efeitos perigosos de pesticidas para as abelhas. Estes programas baseiam-se numa progressão sequencial de ensaios de toxicidade, que evolui de ensaios laboratoriais para experiências parcial ou totalmente realizadas no campo (1). Os pesticidas podem ser submetidos a ensaio sob a forma de substâncias activas (s.a.) ou de produtos formulados.

A sensibilidade das abelhas e o rigor do procedimento experimental devem ser verificados pela inclusão de um padrão tóxico nos ensaios.

1.2. DEFINIÇÕES

Toxicidade oral aguda: conjunto dos efeitos adversos que se manifestam num período máximo de 96 horas após a administração oral de uma dose única da substância de ensaio.

Dose: quantidade consumida da substância de ensaio. A dose é expressa em massa (μg) de substância de ensaio por animal (μg/abelha). O facto de as abelhas serem alimentadas de forma colectiva não permite calcular a dose efectiva por cada animal. No entanto, é possível determinar a dose média (massa total de substância em ensaio consumida/número de abelhas em ensaio em cada gaiola).

DL_{50} (dose letal média) oral: dose única, calculada estatisticamente, de uma substância susceptível de causar a morte de 50 % dos animais quando administrada por via oral. O valor da DL_{50} é expresso em μg de substância de ensaio por abelha. Em ensaios de pesticidas, a substância de ensaio pode ser uma substância activa (s.a.) ou um produto formulado, que contém uma ou várias substâncias activas.

Mortalidade: um animal é considerado morto quando permanece completamente imóvel.

1.3. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

O método baseia-se na exposição de abelhas domésticas (Apis *mellifera)* obreiras adultas a uma gama de doses da substância de ensaio dispersa numa solução de sacarose. Após a administração das doses, as abelhas são alimentadas com a mesma solução, sem a substância de ensaio. A mortalidade das abelhas é registada diariamente, num período nunca inferior a 48 horas, sendo depois comparada com valores de controlo. Caso a taxa de mortalidade aumente entre 24 e 48 horas após a administração das doses, mantendo-se a mortalidade dos controlos num nível aceitável (ou seja, ≤ 10 %), o ensaio deverá ser prolongado até um máximo de 96 horas. Os resultados deverão ser analisados de forma a calcular a DL_{50} às 24 horas e às 48 horas e, em caso de prolongamento do ensaio, às 72 horas e às 96 horas.

▼B

1.4. VALIDADE DO ENSAIO

O ensaio será considerado válido, desde que se verifiquem as seguintes condições:

— a mortalidade média na totalidade dos controlos no final do ensaio não deverá ser superior a 10 %,

— a DL_{50} do padrão tóxico deverá enquadrar-se na gama de concentrações especificada.

1.5. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.5.1. **Recolha de abelhas**

O ensaio deve ser realizado com obreiras adultas jovens da mesma raça, isto é, abelhas da mesma idade, em idênticas condições de alimentação, etc. As abelhas devem provir de colónias governadas por rainhas, bem alimentadas, saudáveis, tanto quanto possível isentas de doenças e com historial e estado fisiológico conhecidos. As abelhas podem ser recolhidas na manhã do dia do ensaio ou na noite anterior, desde que permaneçam nas condições de ensaio até à realização deste. Consideram-se adequadas para o ensaio as abelhas recolhidas de favos sem postura. Devido ao facto de as abelhas sofrerem alterações fisiológicas no início da Primavera e no final do Outono, deverão evitar-se recolhas durante estes períodos. Caso seja necessário realizar ensaios nestas épocas do ano, podem usar-se abelhas eclodidas numa incubadora e alimentadas com pólen colhido da colmeia e solução de sacarose durante uma semana. As abelhas tratadas com substâncias químicas (tais como antibióticos, produtos varroacidas, etc.) não devem ser usadas em ensaios de toxicidade até quatro semanas após o final do último tratamento.

1.5.2. **Condições de alojamento e alimentação**

Devem usar-se gaiolas bem ventiladas e fáceis de limpar. As gaiolas podem ser construídas com quaisquer materiais apropriados, tais como aço inoxidável, tela de arame ou plástico. Podem ainda ser usadas gaiolas de madeira descartáveis. Por norma, cada gaiola deverá conter, de preferência, um grupo de dez abelhas. As gaiolas usadas nos ensaios devem possuir dimensões adequadas ao número de abelhas a alojar, de modo a proporcionarem espaço suficiente.

As abelhas devem ser mantidas no escuro, numa sala de ensaios, à temperatura de 25 ± 2 °C. A humidade relativa, normalmente de cerca de 50-70 %, deverá ser registada ao longo do ensaio. Os procedimentos de manipulação, incluindo o tratamento e as observações, poderão ser efectuados com iluminação (natural). As abelhas são alimentadas com uma solução aquosa de sacarose a uma concentração de 500 g/l (50 % p/v). Após a administração das doses de ensaio, as abelhas devem dispor de alimento *ad libitum*. Deve usar-se um sistema de alimentação que permita registar a quantidade de alimento consumido em cada gaiola (ver ponto 1.6.3.1). Para tal, pode utilizar-se um tubo de vidro, com cerca de 50 mm de comprimento e 10 mm de largura e a extremidade aberta estreitada para cerca de 2 mm de diâmetro.

1.5.3. **Preparação das abelhas**

As abelhas recolhidas são distribuídas aleatoriamente por gaiolas de ensaio, as quais, por sua vez, são dispostas ao acaso na sala de ensaios.

▼B

Antes do ensaio, as abelhas podem ser privadas de alimento por um período não superior a duas horas. Este tratamento é recomendável, uma vez que assegura que, no início do ensaio, todas as abelhas se encontram em idênticas condições no que respeita ao conteúdo intestinal. Antes de dar início ao ensaio, as abelhas moribundas devem ser retiradas e substituídas por abelhas saudáveis.

1.5.4. **Preparação das doses**

Caso a substância a testar seja miscível com água, poderá ser directamente dispersa numa solução de sacarose a 50 %. No caso de produtos industriais e substâncias de baixa solubilidade em água, podem usar-se outros veículos, tais como solventes orgânicos, emulsionantes ou dispersantes de baixa toxicidade para as abelhas (por exemplo, acetona, dimetilformamida, dimetilsulfóxido), A concentração do veículo depende da solubilidade da substância de ensaio, devendo ser idêntica para todas as concentrações testadas. Na generalidade dos casos, é adequado utilizar (e não ultrapassar) uma concentração de 1 %.

Devem preparar-se as soluções de controlo apropriadas, ou seja, utilizando um solvente ou dispersante para tornar a substância de ensaio solúvel. Assim, deverão ser administradas, a dois grupos de controlo distintos, duas soluções: uma em água e outra em água com sacarose, ambas contendo o solvente/veículo na mesma concentração que as soluções de dosagem.

1.6. PROCEDIMENTO

1.6.1. **Grupos de ensaio e de controlo**

O número de doses e de repetições usado no ensaio deverá satisfazer os requisitos estatísticos para a determinação das DL_{50}, com limites de confiança de 95 %. De uma forma geral, é necessário usar cinco doses em série geométrica, com um factor não superior a 2,2 e cobrindo uma gama de concentrações que abranja a DL_{50}. No entanto, o factor de diluição e o número de concentrações por dosagem deverão ser determinados em função do declive da curva de toxicidade (dose *versus* mortalidade) e tomando em consideração o método estatístico adoptado para a análise dos resultados. Um ensaio de determinação de gama de concentrações permitirá escolher as concentrações apropriadas para a dosagem.

Cada concentração a testar deve ser aplicada em, pelo menos, três grupos idênticos, cada um constituído por 10 abelhas. Além da série em ensaio, devem ser testados pelo menos três grupos de controlo, formados por 10 abelhas cada um. Devem ainda ser incluídos os grupos de controlo apropriados para os solventes/veículos usados (ver ponto 1.5.4).

1.6.2. **Padrão tóxico**

A série em ensaio deve incluir um padrão tóxico. Devem seleccionar-se pelo menos três doses deste padrão, de modo a abranger o valor previsto para a DL_{50}. Para cada dose de ensaio, devem usar-se, pelo menos, três gaiolas idênticas, cada uma contendo dez abelhas. O padrão tóxico mais vulgarmente utilizado é o dimetoato. A DL_{50} oral às 24 horas descrita para este composto situa-se na gama de 0,10 a 0,35 μg s.a./abelha (2). No entanto, podem ser usados outros padrões tóxicos, desde que existam dados suficientes para verificar a resposta prevista à dose administrada (por exemplo, paratião).

▼B

1.6.3. **Exposição**

1.6.3.1. *Administração de doses*

A cada grupo de abelhas em ensaio, devem ser administrados 100--200 μl de solução aquosa de sacarose a 50 %, contendo a substância de ensaio na concentração apropriada. No ensaio de produtos de baixa solubilidade, toxicidade ou concentração no preparado, será necessário aumentar a proporção dos mesmos na solução de sacarose e utilizar volumes superiores. Deverá controlar-se a quantidade de solução tratada, consumida por cada grupo. Uma vez consumido o alimento tratado (normalmente num período de três a quatro horas), o sistema de alimentação deve ser retirado da gaiola e substituído por outro contendo apenas solução de sacarose, a qual deverá ser fornecida então *ad líbitum*. Em alguns casos, poderá ocorrer a rejeição das doses correspondentes às concentrações mais elevadas da de ensaio, o que terá como resultado um consumo de alimento reduzido ou nulo. Após um lapso máximo de seis horas, a solução tratada que não tenha sido consumida deverá ser substituída pela solução de sacarose sem aditivos. Deve avaliar-se a quantidade da solução tratada consumida, medindo, por exemplo, o volume ou o peso da solução não consumida.

1.6.3.2. *Duração*

O ensaio deverá prolongar-se, de preferência, até 48 horas após a substituição da solução em ensaio pela solução de sacarose sem aditivos. Se, após as primeiras 24 horas, a mortalidade continuar a aumentar em mais de 10 %, o ensaio deverá ser prolongado até um máximo de 96 horas, desde que a mortalidade nos controlos não exceda 10 %.

1.6.4. **Observações**

Devem efectuar-se registos de mortalidade decorridas quatro horas, 24 horas e 48 horas após o início do ensaio (ou seja, após a administração da dose). Em caso de prolongamento do período de observação, deverão realizar-se avaliações suplementares a intervalos de 24 horas, até um máximo de 96 horas, desde que a mortalidade dos grupos de controlo não exceda 10 %.

Deverá ser determinada a quantidade de solução consumida por cada grupo. A comparação entre as taxas de consumo de solução tratada e não tratada durante o período de seis horas em que esta é fornecida aos animais poderá dar informações sobre a palatabilidade do alimento tratado.

Deverão ser objecto de registo todas as eventuais anomalias de comportamento verificadas durante o período do ensaio.

1.6.5. **Teste-limite**

Em determinadas circunstâncias (por exemplo, quando se prevê que a substância de ensaio apresente um baixo nível de toxicidade), pode efectuar-se um teste-limite, usando 100 μg s.a./abelha, de forma a certificar-se de que a DL_{50} é superior a este valor. Deve seguir-se um procedimento idêntico ao descrito acima, incluindo o uso de três grupos duplicados para a dose de ensaio, a realização dos controlos relevantes e a avaliação da quantidade de alimento tratado consumida, assim como o uso de um padrão tóxico. Se ocorrer mortalidade, deverá realizar-se um estudo completo. Todos os efeitos subletais, caso existam, deverão ser registados (ver ponto 1.6.4).

▼B

2. **DADOS E RELATÓRIO**

2.1. DADOS

Os dados devem ser resumidos num quadro, indicando, para cada grupo em tratamento (e para os grupos de controlo e os associados ao padrão tóxico), o número de abelhas usado e a mortalidade em cada momento de observação, bem como o número de abelhas que apresentam um comportamento anómalo. Os dados relativos à mortalidade devem ser analisados mediante métodos estatísticos adequados (por exemplo, análise probit, média móvel, teoria do binómio relativamente à probabilidade) (3) (4). Devem ser traçadas curvas dose-resposta para cada tempo de observação recomendado, procedendo-se depois ao cálculo dos respectivos declives e à determinação das doses letais médias (DL_{50}) com limites de confiança de 95 %. Podem efectuar-se correcções na mortalidade dos grupos de controlo, usando os valores de correcção de Abbott (4) (5). Nos casos em que o alimento tratado não tenha sido totalmente consumido, deverá determinar-se a dose de substância de ensaio consumida por cada grupo. A DL_{50} deverá ser expressa em µg de substância de ensaio por abelha.

2.2. RELATÓRIO DO ENSAIO

O relatório do ensaio deverá incluir as seguintes informações:

2.2.1. **Substância de ensaio:**

— natureza física e propriedades físico-químicas relevantes (por exemplo, estabilidade na água, pressão de vapor),

— dados de identificação química, incluindo a fórmula estrutural, o grau de pureza [ou seja, no caso de pesticidas, a identidade e a concentração da(s) substância(s) activa(s)].

2.2.2. **Espécies submetidas a ensaio:**

— nome científico, estirpe, idade aproximada (em semanas), método de recolha, data da recolha,

— dados informativos sobre as colónias usadas para recolha das abelhas submetidas a ensaio, incluindo o estado de saúde, a ocorrência de doenças de adultos, eventuais tratamentos previamente aplicados, etc.

2.2.3. **Condições do ensaio:**

— temperatura e humidade relativa da sala de ensaios,

— condições de alojamento, incluindo o tipo, as dimensões e o material de construção das gaiolas,

— métodos de preparação das soluções-mãe e soluções de ensaio (em caso de utilização de um solvente não aquoso, deve indicar-se a sua natureza e a respectiva concentração),

— planeamento do ensaio, ou seja, o número de concentrações de ensaio e os respectivos valores, bem como o número de controlos; para cada concentração de ensaio e para cada controlo, deverá indicar-se o número de gaiolas em duplicado e o número de abelhas em cada uma delas,

— data do ensaio.

▼B

2.2.4. **Resultados:**

— em caso de realização de um estudo preliminar para determinação da gama de concentrações de ensaio, os respectivos resultados,

— dados não processados: mortalidade correspondente a cada dose de ensaio em cada momento de observação,

— representação gráfica das curvas dose-resposta no final do ensaio,

— valores DL_{50}. com limites de confiança de 95 %, para cada período de observação recomendado, tanto para a substância de ensaio, como para o padrão tóxico,

— tratamentos estatísticos usados para a determinação da DL_{50},

— mortalidade nos controlos,

— outros efeitos biológicos observados ou medidos, como, por exemplo, anomalias no comportamento das abelhas (incluindo rejeição da dose de ensaio), taxa de consumo de alimento em grupos tratados e em grupos não tratados,

— qualquer desvio em relação aos procedimentos aqui descritos, assim como quaisquer outras informações relevantes.

3. **REFERÊNCIAS**

(1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmenta! Risk Assessment of Plant Protection Products — Honeybees. EPPO Bulletin, Vol. 23, N.1, p. 151-165. March 1993.

(2) Gough, H. J., McIndoe, E.C., Lewis, G.B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees *(Apis mellifera* L.) 1981-1992. Journal of Apicultural Research, 22, p. 119-125.

(3) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, p. 99-113.

(4) Finney, D. J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New York.

(5) Abbott, W. S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol., 18, p. 265-267.

▼B

C.17. ABELHAS DOMÉSTICAS — ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA POR CONTACTO

1. MÉTODO

O presente método de ensaio de toxicidade aguda baseia-se na publicação OECD TG 214 (1998) (normas de ensaio da OCDE).

1.1. INTRODUÇÃO

O presente ensaio de toxicidade constitui um método laboratorial, destinado a avaliar a toxicidade aguda por contacto de produtos fitofarmacêuticos e outras substâncias químicas para as abelhas domésticas obreiras adultas.

Os processos de avaliação e verificação das características tóxicas de substâncias podem exigir a determinação da toxicidade aguda por contacto para as abelhas domésticas. Esta situação verifica-se, por exemplo, quando há a probabilidade de exposição de abelhas a um produto químico específico. O ensaio de toxicidade aguda por contacto permite determinar a toxicidade de pesticidas e outras substâncias químicas para as abelhas. Os seus resultados condicionarão a necessidade de efectuar ulteriores avaliações. O método é especialmente adequado para uso em programas passo-a-passo, destinados a avaliar os efeitos perigosos de pesticidas para as abelhas. Estes programas baseiam-se numa progressão sequencial de ensaios de toxicidade, que evolui de ensaios laboratoriais para experiências parcial ou totalmente realizadas no campo (1). Os pesticidas podem ser submetidos a ensaio sob a forma de substâncias activas (s.a.) ou de produtos formulados.

A sensibilidade das abelhas e o rigor do procedimento experimental devem ser verificados pela inclusão de um padrão tóxico nos ensaios.

1.2. DEFINIÇÕES

Toxicidade aguda por contacto: conjunto dos efeitos adversos que se manifestam num período máximo de 96 horas após a aplicação tópica de uma dose única de uma substância.

Dose: quantidade aplicada da substância de ensaio. O valor da dose é expresso em massa (μg) de substância de ensaio por animal (μg/abelha).

DL_{50} (dose letal média) por contacto: dose única, calculada estatisticamente, de uma substância susceptível de causar a morte de 50 % dos animais quando administrada por contacto. O valor da DL_{50} é expresso em μg de substância de ensaio por abelha. Em ensaios de pesticidas, a substância de ensaio pode ser uma substância activa (s.a) ou um produto formulado, contendo uma ou várias substâncias activas.

Mortalidade: um animal é considerado morto quando permanece completamente imóvel.

1.3. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

O método baseia-se na exposição de abelhas domésticas *(Apis mellifera)* obreiras adultas a uma gama de doses da substância de ensaio dissolvida num veículo adequado e aplicada directamente no tórax (em gotículas). O ensaio tem a duração de 48 horas. Caso a taxa de mortalidade aumente entre 24 e 48 horas após a aplicação das doses, mantendo-se a mortalidade dos controlos num nível aceitável (ou seja, < 10 %), o ensaio deverá ser prolongado até um máximo de 96 horas. A mortalidade das abelhas é registada diariamente e comparada com valores de controlo. Os resultados deverão ser analisados de forma a calcular a DL_{50} às 24 horas e às 48 horas e, em caso de prolongamento do ensaio, às 72 horas e às 96 horas.

▼B

1.4. VALIDADE DO ENSAIO

O ensaio será considerado válido, desde que se verifiquem as seguintes condições:

— a mortalidade média na totalidade dos controlos no final do ensaio não deverá ser superior a 10 %,

— a DL_{50} do padrão tóxico deverá enquadrar-se na gama de concentrações especificada.

1.5. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.5.1. **Recolha de abelhas**

O ensaio deve ser realizado com obreiras adultas jovens, ou seja, abelhas da mesma idade, em idênticas condições de alimentação, raça idêntica, etc. As abelhas devem provir de colónias governadas por rainhas, bem alimentadas, saudáveis, tanto quanto possível isentas de doenças e com historial e estado fisiológico conhecidos. As abelhas podem ser recolhidas na manhã do dia do ensaio ou na noite anterior, desde que se mantenham nas condições de ensaio até à sua realização. Consideram-se adequadas para o ensaio as abelhas recolhidas de favos sem postura. Devido ao facto de as abelhas sofrerem alterações fisiológicas no início da Primavera e no final do Outono, deverão evitar-se recolhas durante estes períodos. Caso seja necessário realizar ensaios nestas épocas do ano, podem usar-se abelhas eclodidas numa incubadora e alimentadas durante uma semana com pólen colhido da colmeia e solução de sacarose. As abelhas tratadas com substâncias químicas (tais como antibióticos, produtos varroacidas, etc.) não devem ser usadas para ensaios de toxicidade até quatro semanas após o final do último tratamento.

1.5.2. **Condições de alojamento e alimentação**

Devem usar-se gaiolas bem ventiladas e fáceis de limpar. As gaiolas podem ser construídas com quaisquer materiais apropriados, tais como aço inoxidável, tela de arame ou plástico. Podem ainda ser usadas gaiolas de madeira descartáveis. As gaiolas usadas nos ensaios devem possuir dimensões adequadas ao número de abelhas a alojar, de modo a proporcionarem espaço suficiente. Por norma, cada gaiola deverá conter um grupo de dez abelhas.

As abelhas devem ser mantidas no escuro, numa sala de ensaios, à temperatura de 25 ± 2 °C. A humidade relativa, normalmente de cerca de 50-70 %, deverá ser registada ao longo do ensaio. Os procedimentos de manipulação, incluindo o tratamento e as observações, poderão ser efectuados com iluminação (natural). As abelhas são alimentadas com uma solução aquosa de sacarose a uma concentração de 500 g/l (50 % p/v), que deve ser fornecida *ad libitum* durante todo o ensaio por meio de um sistema de alimentação de abelhas. Para tal, pode utilizar-se um tubo de vidro com cerca de 50 mm de comprimento e 10 mm de largura e a extremidade aberta estreitada para cerca de 2 mm de diâmetro.

1.5.3. **Preparação das abelhas**

Para a aplicação da substância de ensaio, as abelhas recolhidas são anestesiadas, podendo usar-se dióxido de carbono ou azoto para o efeito. Deverá minimizar-se a quantidade usada e o tempo de exposição ao anestésico. Antes de dar início ao ensaio, as abelhas moribundas devem ser retiradas e substituídas por abelhas saudáveis.

1.5.4. **Preparação das doses**

A substância de ensaio deverá ser aplicada na forma de solução num veículo, ou seja, num solvente orgânico ou numa solução aquosa contendo um agente molhante. O solvente orgânico mais vulgarmente utilizado é a acetona. No entanto, podem utilizar-se outros compostos de baixa toxicidade para as abelhas, como, por exemplo, dimetilformamida ou dimetilsulfóxido. A aplicação de produtos formulados dispersos em água ou de substâncias orgânicas de elevada polaridade insolúveis em solventes orgânicos pode tornar-se mais fácil se as respectivas soluções forem preparadas numa solução diluída de um agente molhante comercial (por exemplo, Agrai, Cittowett, Lubrol, Triton ou Tween).

▼B

As soluções de controlo devem ser preparadas de forma adequada, isto é, utilizando um solvente ou dispersante para tornar a substância de ensaio solúvel. Deverão ser utilizados dois grupos de controlo distintos, um tratado com água e o outro com o solvente ou dispersante.

1.6. PROCEDIMENTO

1.6.1. **Grupos de ensaio e de controlo**

O número de doses e repetições usados no ensaio deverá satisfazer os requisitos estatísticos para a determinação da DL_{50}, com limites de confiança de 95 %. De uma forma geral, é necessário usar cinco doses em série geométrica, com um factor não superior a 2,2 e cobrindo uma gama de concentrações que abranja a DL_{50}. No entanto, o número de doses deverá ser determinado em função do declive da curva de toxicidade (dose *versus* mortalidade) e tendo em consideração o método estatístico adoptado para a análise dos resultados. Um ensaio de determinação de gama de concentrações permitirá escolher as doses apropriadas.

Cada concentração de ensaio deve ser aplicada em, pelo menos, três grupos idênticos, cada um constituído por dez abelhas.

Além da série em ensaio, devem ser testados pelo menos três grupos de controlo, cada um formado por dez abelhas. Sempre que se utilize um solvente orgânico ou um agente molhante, deverão ser incluídos três grupos de controlo adicionais para estas substâncias, constituídos por dez abelhas cada.

1.6.2. **Padrão tóxico**

A série em ensaio deve incluir um padrão tóxico. Devem seleccionar-se pelo menos três doses deste padrão, de modo a abranger o valor previsto para a DL_{50}. Para cada dose de ensaio, devem usar-se pelo menos três gaiolas, cada uma contendo dez abelhas. O padrão tóxico mais vulgarmente utilizado é o dimetoato. A DL_{50} por contacto às 24 horas descrita para este composto situa-se na gama de 0,10 a 0,30 μg s.a./abelha (2). No entanto, podem ser usados outros padrões tóxicos, desde que existam dados suficientes para verificar a resposta prevista à dose aplicada (por exemplo, paratião).

1.6.3. **Exposição**

1.6.3.1. *Administração de doses*

As abelhas anestesiadas são tratadas individualmente por aplicação tópica. As diferentes doses de ensaio e os controlos são distribuídos de forma aleatória pelas abelhas. As doses são aplicadas com o auxílio de um microaplicador no lado dorsal do tórax de cada abelha, em alíquotas de 1 μl de uma solução contendo a substância de ensaio na concentração apropriada. Caso se justifique, poderão ser usados outros volumes. Após a aplicação, as abelhas são colocadas em gaiolas de ensaio e alimentadas com soluções de sacarose.

1.6.3.2. *Duração*

O ensaio deverá durar, de preferência, 48 horas. Caso a mortalidade aumente em mais de 10 % entre 24 e 48 horas após a aplicação, o ensaio deverá ser prolongado até um máximo de 96 horas, desde que a mortalidade nos controlos não exceda 10 %.

▼B

1.6.4. **Observações**

Devem efectuar-se registos de mortalidade decorridas quatro, 24 e 48 horas após o início do ensaio. Em caso de prolongamento do período de observação, deverão realizar-se avaliações suplementares com intervalos de 24 horas, até um máximo de 96 horas, desde que a mortalidade dos grupos de controlo não exceda 10 %.

Deverão ser objecto de registo todas as eventuais anomalias de comportamento verificadas durante o período do ensaio.

1.6.5. **Teste-limite**

Em determinadas circunstâncias (por exemplo, quando se prevê que a substância de ensaio apresente um baixo nível de toxicidade), pode efectuar-se um teste-limite, usando 100 μg s.a./abelha, de forma a certificar-se de que a DL_{50} é superior a este valor. Deve seguir-se um procedimento semelhante ao descrito acima, incluindo o uso de três grupos duplicados para a dose de ensaio e a realização dos controlos relevantes, assim como o uso de um padrão tóxico. Se ocorrer mortalidade, deverá realizar-se um estudo completo. Todos os efeitos subletais, caso existam, deverão ser registados (ver ponto 1.6.4).

2. **DADOS E RELATÓRIO**

2.1. DADOS

Os dados devem ser resumidos num quadro, indicando, para cada grupo de tratamento (e para os grupos de controlo e os associados ao padrão tóxico), o número de abelhas usadas e a mortalidade em cada momento de observação, bem corno o número de abelhas que apresentam um comportamento anómalo. Os dados de mortalidade devem ser analisados mediante métodos estatísticos adequados (por exemplo, análise probit, média móvel, teoria do binómio relativa à probabilidade) (3) (4). Devem ser traçadas curvas dose-resposta para cada tempo de observação recomendado (ou seja, 24 horas, 48 horas e, se for relevante, 72 horas e 96 horas), procedendo-se depois ao cálculo dos respectivos declives e à determinação das doses letais médias (DL_{50}) com limites de confiança de 95 %. Podem efectuar-se correcções na mortalidade dos controlos, usando os valores de correcção de Abbott (4) (5). A DL_{50} deverá ser expressa em μg de substância de ensaio por abelha.

2.2. RELATÓRIO DO ENSAIO

O relatório do ensaio deverá incluir as seguintes informações:

2.2.1. **Substância de ensaio:**

— natureza física e propriedades físico-químicas (por exemplo, estabilidade na água, pressão de vapor),

— dados de identificação química, incluindo a fórmula estrutural, o grau de pureza [ou seja, no caso de pesticidas, a identidade e a concentração da(s) substância(s) activa(s)].

2.2.2. **Espécies submetidas a ensaio:**

— nome científico, raça, idade aproximada (em semanas), método de recolha, data da recolha,

— dados informativos sobre as colónias usadas para recolha das abelhas submetidas a ensaio, incluindo o estado de saúde, a ocorrência de doenças de adultos, eventuais tratamentos previamente aplicados, etc.

▼B

2.2.3. **Condições do ensaio:**

— temperatura e humidade relativa da sala de ensaios,

— condições de alojamento, incluindo o tipo, as dimensões e o material de construção das gaiolas,

— métodos de administração da substância de ensaio (indicando, por exemplo, o solvente usado como veículo, o volume aplicado da solução de ensaio e os anestésicos usados),

— planeamento do ensaio, ou seja, o número de doses de ensaio e as respectivas concentrações, bem como o número de controlos; para cada dose de ensaio e para cada controlo, deverá indicar-se o número de gaiolas em duplicado e o número de abelhas em cada uma delas,

— data do ensaio.

2.2.4. **Resultados:**

— em caso de realização de um estudo preliminar para determinação da gama de concentrações de ensaio, os respectivos resultados,

— dados não processados: mortalidade correspondente a cada concentração de ensaio em cada momento de observação,

— representação gráfica das curvas dose-resposta no final do ensaio,

— valores de DL_{50}, com limites de confiança de 95 %, para cada período de observação recomendado, tanto para a substância de ensaio, como para o padrão tóxico,

— tratamentos estatísticos usados para a determinação da DL_{50},

— mortalidade nos controlos,

— outros efeitos biológicos observados ou medidos e qualquer reacção anormal das abelhas,

— qualquer desvio em relação aos procedimentos aqui descritos, assim como quaisquer outras informações relevantes.

3. **REFERÊNCIAS**

(1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products — Honeybees. EPPO bulletin, Vol. 23, N.1, p. 1 51-165. March 1993.

(2) Gough, H. J., McIndoe, E. C, Lewis, G. B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (*Apis mellifera* L.), 1981-1992. Journal of Apicultural Research 22, p. 119-125.

(3) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, p. 99-11 3.

(4) Finney, D. J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New York.

(5) Abbott, W. S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol. 18, p. 265-267.

▼B

C.18. ADSORÇÃO/DESSORÇÃO POR RECURSO A UM MÉTODO DE EQUILÍBRIO POR LOTES DE SOLOS

1. MÉTODO

O presente método é uma reprodução do método OCDE TG 106, para a determinação da adsorção/dessorção em solos por recurso a um método de equilíbrio por lotes (2000).

1.1. INTRODUÇÃO

O presente método baseia-se em ensaios específicos, bem como nos resultados de um seminário (*workshop*) para a selecção de solos, com vista ao desenvolvimento de um ensaio de adsorção (1) (2) (3) (4). O método tem também em conta as directrizes em vigor a nível nacional (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11).

Os estudos de adsorção/dessorção permitem obter informações essenciais sobre a mobilidade dos produtos químicos e sua distribuição nos diversos componentes da biosfera (edáfico, aquático e atmosférico) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21). As informações recolhidas podem ser utilizadas na previsão ou estimativa, nomeadamente, da disponibilidade de uma substância química para degradação (22) (23), transformação e absorção pelos organismos vivos (24), do perfil de lixiviação pelos solos (16) (18) (19) (21) (25) (26) (27) (28), da volatilidade nos solos (21) (29) (30) e da transferência da superfície de solos para águas naturais (18) (31) (32). Os dados de adsorção podem ser utilizados para fins comparativos, bem como de modelização (19) (33) (34) (35).

A distribuição de uma substância química entre o solo e uma fase aquosa constitui um processo complexo que depende de diversos factores, designadamente a natureza química da substância (12) (36) (37) (38) (39) (40), as características do solo (4) (12) (13) (14) (41) (42) (43) (44) (45) (46) (47) (48) (49) e factores climáticos tais como a pluviosidade, a temperatura, a exposição ao sol e os ventos. Deste modo, os numerosos fenómenos e mecanismos envolvidos no processo de adsorção de uma substância pelo solo não podem ser totalmente definidos por um modelo laboratorial simplificado do tipo descrito no presente método. Todavia, embora a presente contribuição não abranja todos os casos possíveis no domínio ambiental, fornece informações valiosas sobre o impacto ambiental da adsorção de uma substância.

Ver também a introdução geral.

1.2. ÂMBITO

O presente método visa determinar o comportamento de uma substância no solo em termos de adsorção/dessorção. O objectivo consiste em obter um parâmetro que possa ser utilizado para prever a partição em diversas condições ambientais; para tal, determinam-se os coeficientes de adsorção em equilíbrio de um produto químico em vários solos, em função das características destes últimos (por exemplo, teor de carbono orgânico, teor de argila, textura e pH). Devem utilizar-se diferentes tipos de solos, de modo a abranger tanto quanto possível as interacções de uma determinada substância com solos de ocorrência natural.

No presente método, a adsorção é entendida como o processo de ligação de uma substância à superfície dos solos, não se efectuando qualquer distinção entre os diversos processos de adsorção (adsorção física e química), bem como entre os processos de degradação superficial catalisada, adsorção na massa e reacção química. Não é tida em conta a adsorção em partículas coloidais (diâmetro $< 0{,}2$ μm) produzidas nos solos.

▼B

Os parâmetros referentes ao solo considerados mais importantes no contexto da adsorção são os seguintes: teor de carbono orgânico (3) (4) (12) (13) (14) (41) (43) (44) (45) (46) (47) (48), teor de argila e textura dos solos (3) (4) (41) (42) (43) (44) (45) (46) (47) (48) e pH, no caso de compostos ionizáveis (3) (4) (42). Outros parâmetros que podem apresentar um impacto na adsorção-dessorção do solo são a capacidade de permuta catiónica efectiva (ECHC), o teor de ferro amorfo e de óxidos de alumínio, em especial em solos vulcânicos e tropicais (4), bem como a superfície específica (49).

O ensaio foi concebido para avaliar a adsorção de uma substância em vários tipos de solos, com diversos teores de carbono orgânico, argila, textura e pH, sendo constituído por três fases:

Fase 1: Estudo preliminar para a determinação:

— da razão solo/solução,

— do tempo necessário para atingir o equilíbrio de adsorção, bem como da quantidade de substância teste adsorvida no estado de equilíbrio,

— da adsorção da substância em estudo na superfície dos recipientes de ensaio, bem como da estabilidade da substância durante o período de ensaio.

Fase 2: Ensaio de selecção: estuda-se a cinética de adsorção a concentração constante em cinco tipos diferentes de solos, determinando-se os coeficientes de distribuição K_d e K_{oc}.

Fase 3: Determinação das isotérmicas de adsorção de Freundlich, de modo a avaliar a influência da concentração na extensão da adsorção nos solos.

Estudo da dessorção através da respectiva cinética, bem como das isotérmicas de dessorção de Freundlich (apêndice 1).

1.3. DEFINIÇÕES E UNIDADES

Símbolo	Definição	Unidades
A_{t_i}	percentagem de adsorção no instante t_i	%
A_{eq}	percentagem de adsorção no estado de equilíbrio de adsorção	%
$m_s^{ads}(t_i)$	massa de substância em estudo adsorvida no solo no instante t_i	µg
$m_s^{ads}(\Delta t_i)$	massa de substância em estudo adsorvida no solo no intervalo de tempo At_i	µg
$m_s^{ads}(eq)$	massa de substância em estudo adsorvida no solo no estado de equilíbrio de adsorção	µg
m_0	massa de substância em estudo no recipiente de ensaio, no início do mesmo	µg
$m_m^{ads}(t_i)$	massa de substância em estudo determinada numa alíquota (v_a^A) no instante t_j	µg
$m_{aq}^{ads}(eq)$	massa de substância em estudo na solução, no estado de equilíbrio de adsorção	µg
m_{solo}	quantidade de fase edáfica, expressa em massa seca	g

▼B

Símbolo	Definição	Unidades
C_{st}	concentração mássica da solução-mãe da substância	µg cm^{-3}
C_0	concentração mássica inicial da solução de ensaio em contacto com o solo	µg cm^{-3}
$C_{aq}^{ads}(t_i)$	concentração mássica da substância na fase aquosa no instante t_i em que a análise é efectuada	µg cm^{-3}
$C_s^{ads}(eq)$	teor de substância adsorvida no solo no estado de equilíbrio de adsorção	µg g^{-1}
$C_{aq}^{ads}(eq)$	concentração mássica da substância na fase aquosa no estado de equilíbrio de adsorção	µg cm^{-3}
V_0	volume inicial da fase aquosa em contacto com o solo durante o ensaio de adsorção	cm^3
v_a^A	volume da alíquota em que se determina a substância de ensaio	cm^3
	coeficiente de distribuição da adsorção	cm^3 g^{-1}
	coeficiente de adsorção normalizado relativo ao carbono orgânico	cm^3 g^{-1}
	coeficiente de adsorção normalizado da matéria orgânica	cm^3 g^{-1}
K_F^{ads}	coeficiente de adsorção de Freundlich	μg^{-1}
l/n	expoente de Freundlich	
D_{t_i}	percentagem de dessorção no instante t_i	%
$D_{\Delta t_i}$	percentagem de dessorção no intervalo Δt_i	%
K_{des}	coeficiente de dessorção aparente	cm^3 g^{-1}
K_F^{des}	coeficiente de dessorção de Freundlich	µg $^{1-1/n}$ (cm^3) $^{1/n}$ g^{-1}
$m_{aq}^{des}(t_i)$	massa de substância de ensaio dessorvida do solo no instante t_i	µg
$m_m^{des}(\Delta t_i)$	massa de substância de ensaio dessorvida do solo no intervalo Δt_j	µg
$m_m^{des}(eq)$	massa de substância determinada analiticamente na fase aquosa no estado de equilíbrio de dessorção	µg
$m_{aq}^{des}(eq)$	massa total de substância em estudo no estado de equilíbrio de dessorção	µg
$m_s^{des}(\Delta t_i)$	massa de substância que permanece adsorvida no solo após o intervalo At_i	µg
m_{aq}^A	massa de substância remanescente do equilíbrio de adsorção devido a uma substituição incompleta de volumes	µg
$C_s^{des}(eq)$	teor de substância em estudo que permanece adsorvida no solo no estado de equilíbrio de dessorção	µg g^{-1}

▼B

Símbolo	Definição	Unidades
()	concentração mássica de substância de ensaio na fase aquosa no estado de equilíbrio de dessorção	µg cm^3
V_T	volume total da fase aquosa em contacto com o solo durante o ensaio de cinética de dessorção efectuado pelo método sequencial	cm^3
	volume de sobrenadante removido do tubo após atingir o estado de equilíbrio de adsorção e substituído por igual volume de solução de $CaCl_2$ 0,01 M	cm^3
v_a^D	volume da alíquota recolhida para fins analíticos a partir do instante (i), durante o ensaio de cinética de dessorção efectuado pelo método sequencial	cm^3
V_r^r	volume de solução recolhida do tubo (i) para a determinação da substância em estudo, no ensaio de cinética de dessorção (método paralelo)	cm^3
V_r^F	volume de solução recolhida do tubo para a determinação da substância em estudo, no estado de equilíbrio de dessorção	cm^3
MB	balanço de massas	%
m_E	massa total de substância em estudo extraída do solo e das paredes do recipiente de ensaio em duas etapas	µg
V_{rec}	volume de sobrenadante recolhido após atingir o estado de equilíbrio de adsorção	cm^3
P_{ow}	coeficiente de partição octanol/água	
pKa	constante de dissociação	
S_w	solubilidade em água	g l^{-1}

1.4. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

Adicionam-se a amostras de solos de massa seca conhecida, previamente equilibradas com $CaCl_2$, 0,01 M, volumes conhecidos de soluções da substância em estudo em $CaCl_2$, 0,01 M, de concentração conhecida, marcadas ou não com radioisótopos. A mistura é agitada durante um período adequado. As suspensões de solo são separadas por centrifugação e eventualmente filtradas, procedendo-se à análise da fase aquosa. A quantidade de substância em estudo adsorvida pela amostra de solo é calculada na forma de diferença entre a quantidade de substância inicialmente presente na solução e a quantidade remanescente no final do ensaio (método indirecto).

Como alternativa, pode determinar-se directamente a quantidade de substância em estudo adsorvida, mediante a análise do solo (método directo). Este processo, que implica a extracção do solo, por etapas, com solventes adequados, é recomendado nos casos em que não possa determinar-se com rigor a diferença das concentrações da substância na solução. A adsorção da substância na superfície dos recipientes de ensaio, a instabilidade da substância no período de ensaio, bem como uma adsorção fraca que determine apenas alterações ligeiras da concentração da solução ou uma forte adsorção que origine concentrações demasiado reduzidas para serem determinadas com rigor, constituem exemplos de tais casos. Se se utilizarem substâncias marcadas com radioisótopos, pode evitar-se a extracção do solo mediante a análise da fase edáfica por combustão seguida de contagem com um contador de cintilação líquida. Trata-se, todavia, de uma técnica não específica, que não permite distinguir as substâncias iniciais dos produtos de transformação, pelo que deve ser utilizada apenas se a substância em estudo for estável no período de duração do ensaio.

▼B

1.5. INFORMAÇÕES RELATIVAS À SUBSTÂNCIA EM ESTUDO

Os reagentes devem ser de qualidade analítica. No caso de substâncias em estudo de composição conhecida não marcadas, recomenda-se um grau de pureza mínimo de 95 %; no caso de substâncias marcadas com radioisótopos, a pureza deve ser de grau radioquímico. Se os isótopos radioactivos possuírem uma meia vida reduzida, devem utilizar-se parâmetros de correcção.

Antes de efectuar um ensaio de adsorção-dessorção, devem conhecer-se as seguintes informações relativas à substância em estudo:

a) Solubilidade em água (A.6);

b) Pressão de vapor (A.4) e/ou constante da lei de Henry;

c) Degradação abiótica: hidrólise em função do pH (C.7);

d) Coeficiente de partição (A.8);

e) Biodegradabilidade fácil (C.4) ou transformação aeróbia/anaeróbia no solo;

f) pKa das substâncias ionizáveis presentes;

g) Fotólise directa em água (por exemplo, espectro de absorção UV-Vis em água, rendimento quântico) e fotodegradação no solo.

1.6. APLICABILIDADE DO ENSAIO

O ensaio é aplicável a substâncias químicas para as quais existe um método analítico suficientemente rigoroso. A estabilidade da substância no período de ensaio é um parâmetro susceptível de influenciar a fiabilidade dos resultados, em especial quando se utiliza o método indirecto. Deve, pois, efectuar-se um ensaio preliminar com o objectivo de verificar a estabilidade; caso ocorra uma transformação no período de ensaio, recomenda-se a análise do solo e das fases aquosas no ensaio principal.

Podem surgir dificuldades na condução do ensaio em substâncias de solubilidade reduzida em água ($S_w < 10^{-4}$ g l^{-1}), bem como em substâncias com carga eléctrica elevada, pode determinar dificuldades, uma vez que a determinação analítica da concentração da fase aquosa não pode ser efectuada com rigor suficiente. Nestes casos, é necessário adoptar medidas adicionais. Nas secções relevantes do presente método fornecem-se orientações para a resolução dos problemas em causa.

Caso se utilizem substâncias voláteis, devem evitar-se perdas durante o processo.

1.7. DESCRIÇÃO DO MÉTODO

1.7.1. **Equipamento e reagentes**

Equipamento corrente de laboratório, nomeadamente:

a) Tubos ou recipientes de ensaio, que devem possuir as seguintes características:

— ser directamente adaptáveis à centrifugadora. de modo a minimizar os erros de manipulação e transferência,

— ser feitos de um material inerte, de modo a minimizar a adsorção da substância em estudo na sua superfície;

▼B

b) Dispositivo de agitação: agitador vertical ou equipamento equivalente; o dispositivo de agitação deve manter a amostra de solo em suspensão durante o processo;

c) Centrifugadora: preferentemente de alta velocidade (por exemplo, força centrífuga > 3 000 g), com controlo de temperatura e capacidade de remover da solução aquosa partículas de diâmetro superior a 0,2 μm. Os tubos ou recipientes devem ser tapados durante a agitação e centrifugação, de modo a evitar perdas por volatilização ou perdas de água; com vista a minimizar a adsorção nos tubos ou recipientes, devem utilizar-se tampas activadas, nomeadamente de teflon;

d) Dispositivo de filtração (opcional): filtros com poros de 0,2 μm, esterilizados e descartáveis. Devem adoptar-se precauções especiais na selecção dos materiais de filtração, de modo a evitar perdas da substância em estudo; no caso de substâncias pouco solúveis, não é recomendável o uso de filtros de matérias orgânicas;

e) Equipamento analítico adequado à determinação da concentração da substância em estudo;

f) Estufa com possibilidade de manter a temperatura entre 103°C e 110°C.

1.7.2. **Caracterização e selecção dos solos**

Os solos devem ser caracterizados pelos três principais parâmetros considerados responsáveis pela capacidade de adsorção: teor de carbono orgânico, teor de argila, textura do solo e pH. Como referido *supra* (Âmbito), devem ter-se em conta quaisquer outras propriedades físico-químicas do solo que possam apresentar impacto na adsorção/ /dessorção de uma determinada substância.

Os métodos utilizados para a caracterização dos solos são bastante importantes, podendo influenciar os resultados de modo significativo. Deste modo, recomenda-se a determinação do pH do solo numa solução de $CaCl_2$, 0,01 M (solução utilizada no ensaio de adsorção/ /dessorção) de acordo com o método ISO correspondente (ISO-10390--1). Recomenda-se também a determinação de outras propriedades importantes do solo por recurso a métodos normalizados (por exemplo manual ISO de análise dos solos «Handbook of Soil Analysis»); a análise dos dados de adsorção/dessorção poderá assim basear-se em parâmetros globalmente normalizados. As referências (50-52) fornecem algumas directrizes referentes aos métodos normalizados existentes para a análise e caracterização dos solos. No que respeita à calibração dos métodos de ensaio aplicáveis aos solos, recomenda-se o uso de amostras de solos de referência.

O quadro 1 fornece directrizes para a selecção dos solos a utilizar nos ensaios de adsorção/dessorção. Os sete tipos de solos seleccionados são característicos das regiões temperadas. No caso da utilização de substâncias ionizáveis, os solos seleccionados devem possuir uma gama alargada de pH, de modo a que possa avaliar-se a adsorção da substância nas suas formas ionizada e não ionizada. Na secção 1.9 (Realização do ensaio) apresentam-se orientações relativas ao número de solos diferentes que devem ser utilizados nas várias fases do ensaio.

Caso se utilizem outros tipos de solos, estes últimos devem ser caracterizados pelos mesmos parâmetros, devendo as suas propriedades apresentar uma variação semelhante à dos solos descritos no quadro 1, mesmo que não satisfaçam os critérios de forma rigorosa.

▼B

Quadro 1

Directrizes para a selecção das amostras de solos a utilizar nos ensaios de adsorção-dessorção

Tipo de solo	Gama de pH (em $CaCl_2$ 0,01 M)	Teor de carbono orgânico (%)	Teor de argila (%)	Textura (1)
1	4,5 - 5,5	1,0 - 2,0	65-80	argilosa
2	> 7,5	3,5 - 5,0	20-40	argilo-limosa
3	5,5 - 7,0	1,5 - 3,0	15-25	franco-limosa
4	4,0 - 5,5	3,0 - 4,0	15-30	limosa
5	< 4,0 - 6,0 (2)	< 0,5 - 1,5 (2) (3)	< 10-15 (2)	limo-arenosa
6	> 7,0	< 0,5 - 1,0 (2) (3)	40-65	argilo-limosa/argilosa
7	< 4,5	> 10	< 10	arenosa/limo-arenosa

(1) Em conformidade com o sistema da FAO e dos Estados Unidos (85).
(2) As variáveis respectivas devem, preferencialmente, exibir valores incluídos nas gamas indicadas. Todavia, caso se observem dificuldades em encontrar solos adequados, podem utilizar-se valores inferiores aos mínimos indicados.
(3) A utilização de solos com teor de carbono orgânico inferior a 0,3 % poderá perturbar a correlação entre o referido teor e a adsorção. Recomenda-se, pois, a utilização de solos com um teor mínimo de carbono orgânico de 0,3 %.

1.7.3. **Recolha e armazenagem das amostras de solos**

1.7.3.1. *Recolha*

Não se recomendam técnicas ou instrumentos específicos de amostragem; a técnica a utilizar depende do objectivo do ensaio (53) (54) (55) (56) (57) (58).

Deve ter-se em conta o seguinte:

a) São necessárias informações pormenorizadas sobre a história do local de recolha, nomeadamente a localização, o tipo de vegetação presente, o eventual tratamento com pesticidas e/ou adubos, a adição de matéria biológica e a contaminação acidental. No que respeita à descrição do referido local, devem seguir-se as recomendações da norma ISO relativa à recolha de amostras de solos (ISO 10381-6);

b) O local de recolha das amostras deve ser definido por UTM (Universal *Transversal Mercator-Projection/European Horizontal Datum)* ou por coordenadas geográficas; o que permitirá a recolha futura de tipos específicos de solos ou contribuir para a definição dos solos em diversos sistemas de classificação utilizados em países diferentes. As amostras devem ser recolhidas apenas em horizontes A, até uma profundidade máxima de 20 cm. Se, no caso particular do solo n.º 7, se encontrar presente uma componente de horizonte O_h, a mesma deve ser incluída na amostragem.

As amostras de solo devem ser transportadas em recipientes e a temperaturas tais que as suas propriedades não sofram alterações significativas.

▼B

1.7.3.2. *Armazenagem*

É preferível a utilização de solos recentemente recolhidos. Nos casos em que tal não for possível, os solos podem ser armazenados à temperatura ambiente, numa atmosfera seca. Não se recomenda qualquer período-limite de armazenagem; contudo, no caso dos solos armazenados há mais de três anos, deve determinar-se o teor de carbono orgânico, o pH e CEC antes da utilização.

1.7.3.3. *Manuseamento das amostras de solos e sua preparação para o ensaio*

Os solos são mantidos numa atmosfera seca, à temperatura ambiente (de preferência, entre 20 e 25 ^{o}C). Devem aplicar-se forças de desagregação mínimas, de modo a manter tanto quanto possível a textura original dos solos. Os solos são crivados a uma granulometria inferior ou igual a 2 mm; o processo de crivagem deve ser conforme às recomendações da norma ISO relativa à recolha de amostras de solos (ISO 10381-6). Recomenda-se uma homogeneização cuidadosa, de modo a aumentar a reprodutibilidade dos resultados. O teor de humidade dos solos é determinado com três alíquotas, por aquecimento a 105^{o}C até não se observarem alterações de massa significativas (cerca de 12 h). Para efeitos de cálculo, utiliza-se a massa de solo seco na estufa, isto é a massa corrigida do teor de humidade.

1.7.4. **Preparação da substância em estudo para aplicação no solo**

A substância é dissolvida numa solução de $CaCl_2$, 0,01 M em água destilada ou desionizada; a solução de $CaCl_2$ é utilizada como fase aquosa com o objectivo de melhorar a centrifugação e minimizar a permuta catiónica. De preferência, a concentração da solução-mãe deve ser três ordens de grandeza acima do limite de detecção do método analítico utilizado. Este limiar garante o rigor das determinações no âmbito da metodologia do presente método; além disso, a concentração da solução-mãe deve ser inferior à solubilidade da substância em estudo em água.

A solução-mãe deve ser preparada, preferencialmente, imediatamente antes da aplicação nas amostras de solos, devendo ser mantida fechada e na ausência de luz, a 4^{o}C. O tempo de armazenagem depende da estabilidade da substância e da sua concentração na solução.

No caso de substâncias pouco solúveis (S_w < 10-^{4} g l^{-1}), pode ser necessário utilizar um agente de solubilização adequado. Este último: a) deve ser miscível com a água (por exemplo, metanol ou acetonitrilo); b) a sua concentração não deve exceder 1 % do volume total da solução-mãe e deve ser inferior à concentração da substância de ensaio em contacto com o solo (de preferência menos de 0,1 %); c) não deve ser tensioactivo nem susceptível de participar em processos de solvólise com a substância em estudo. A utilização de um agente de solubilização deve ser justificada de modo pormenorizado no relatório de ensaio.

A dopagem por adição da substância em estudo constitui outra alternativa aplicável a substâncias pouco solúveis. Neste caso, a substância em estudo é dissolvida num solvente orgânico, sendo adicionada uma alíquota ao sistema constituído pelo solo e a solução de $CaCl_2$ 0,01 M em água destilada ou desionizada. O teor de solvente orgânico na fase aquosa deverá ser mantido a níveis tão reduzidos quanto possível, não devendo, em geral, exceder 0,1 %. A técnica em causa tem como desvantagem a não reprodutibilidade dos volumes: o facto de a concentração da substância em estudo e do co-solvente não ser idêntica em todos os ensaios poderá representar um factor de erro adicional.

▼B

1.8. REQUISITOS PRÉVIOS PARA A REALIZAÇÃO DOS ENSAIOS DE ADSORÇÃO/DESSORÇÃO

1.8.1. **Método analítico**

Os principais parâmetros que podem influenciar o rigor das determinações de adsorção/dessorção incluem a precisão do método de análise da solução e da fase adsorvida, a estabilidade e pureza da substância em estudo, o tempo necessário para atingir o equilíbrio de adsorção/dessorção, a amplitude da variação de concentração da solução, a razão solo/solução e as alterações na estrutura do solo durante o processo de equilíbrio (35) (59-62). O apêndice 2 fornece alguns exemplos ligados à precisão das determinações.

Deve verificar-se a fiabilidade do método analítico para a gama de concentrações susceptíveis de ocorrer durante o ensaio. O experimentador deve ser livre de desenvolver um método com exactidão, precisão, reprodutibilidade, limites de detecção e recuperação adequados. A descrição infra fornece directrizes sobre o modo de execução do ensaio em causa.

Agita-se um volume adequado (por exemplo, 100 cm^3) de $CaCl_2$ 0,01 M, durante quatro horas, com uma massa de solo (por exemplo, 20 g) de elevada capacidade de adsorção, isto é, com um teor elevado de carbono orgânico e de argila. As massas e volumes referidos podem variar em função das necessidades analíticas; uma razão solo/solução de 1:5 constitui, em geral, um valor inicial adequado. A mistura é centrifugada, podendo filtrar-se a fase aquosa. Adiciona-se à mistura um determinado volume de solução-mãe da substância em estudo, de modo a obter uma concentração nominal incluída na gama de concentrações susceptíveis de ocorrer durante o ensaio. O referido volume não deverá exceder 10 % do volume final da fase aquosa, de modo a alterar tão pouco quanto possível a natureza da solução de pré-equilíbrio. Procede-se à análise da solução.

Deve efectuar-se um ensaio em branco com o sistema constituído pelo solo e a solução de $CaCl_2$ (suprimindo a substância em estudo), de modo a averiguar a existência de anomalias no método analítico, bem como possíveis efeitos matriciais causados pelo solo.

Os métodos analíticos que podem ser utilizados para as determinações de adsorção/dessorção incluem a cromatografia gás-líquido (GLC), a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), a espectrometria (espectrometria de massa acoplada à GLC e HPLC) e a contagem por cintilação líquida (no caso de substâncias marcadas com radioisótopos). Independentemente do método analítico utilizado, considera-se que o mesmo é adequado se as recuperações forem da ordem de 90 % a 110 % do valor nominal. De modo a permitir efectuar a detecção e avaliação após a partição, os limites de detecção do método analítico devem ser inferiores à concentração nominal em, pelo menos, duas ordens de grandeza.

As características e limites de detecção do método analítico utilizado nos estudos de adsorção desempenham um papel importante na definição das condições de ensaio e no desempenho global do mesmo. O presente método constitui uma abordagem experimental, fornecendo recomendações e directrizes para o desenvolvimento de soluções alternativas caso o método analítico e as condições laboratoriais imponham limitações.

▼B

1.8.2. **Selecção das razões solo/solução adequadas**

A selecção das razões solo/solução adequadas aos estudos de adsorção/dessorção depende do coeficiente de distribuição K_d e do grau de adsorção relativa pretendido. A alteração da concentração da substância na solução determina o rigor estatístico da determinação, baseado na forma da equação de adsorção e do limite da metodologia analítica. Na prática, é conveniente adoptar uma série de razões fixas, relativamente às quais a percentagem adsorvida seja superior a 20 % e, preferentemente, a 50 % (62), devendo procurar manter-se a concentração da substância em estudo na fase aquosa a níveis que possam ser determinados com rigor. Tal facto é particularmente importante no caso de se observarem percentagens de adsorção elevadas.

A estimativa do valor de K_d, quer através de estudos preliminares quer por técnicas de estimativa consagradas (apêndice 3). fornece uma abordagem conveniente da selecção das razões solo/água adequadas. A selecção de uma razão pode ser efectuada com base numa representação das razões solo/solução em função dos valores de K_d, para percentagens fixas de adsorção (figura 1), presumindo a linearidade da equação de adsorção ([1]). A relação aplicável é obtida através do rearranjo da equação (4), de modo a obter a equação (1):

$$\frac{V_0}{m_{solo}} = \left(\frac{m_0}{m_s^{ads}(eq)} - 1\right) K_d \qquad [1]$$

ou, na forma logarítmica, assumíndo que $R = m_{solo}/V_0$ c A_{eq} %/100 $= \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0}$:

$$\log R = -\log K_d + \log\left[\frac{(A_{eq}\%/100)}{(1 - A_{eq}\%/100)}\right] \qquad [2]$$

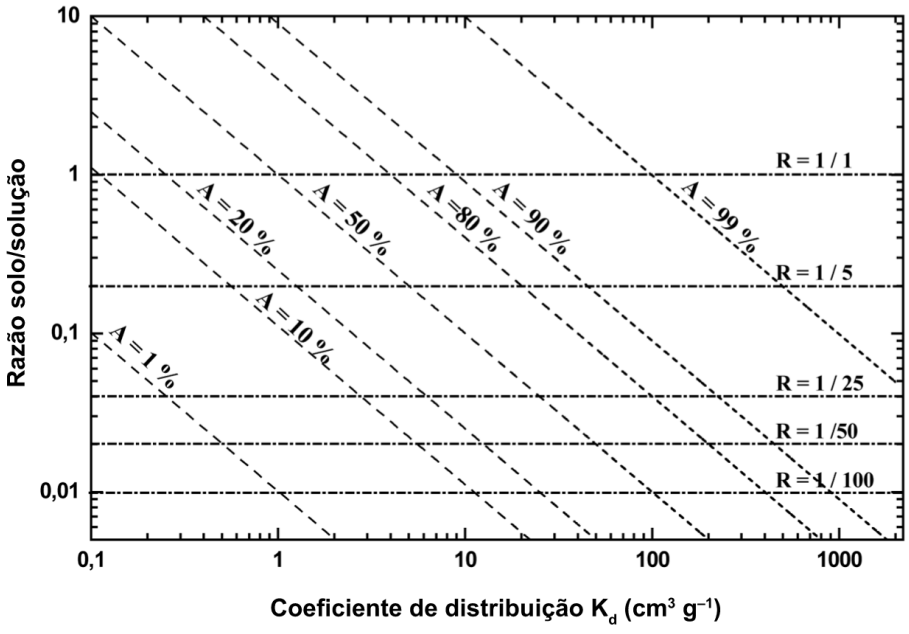


Figura 1. Relação entre as razões solo/solução e K_d, para diferentes percentagens de substância em estudo adsorvida

([1]) $C_s^{ads}(eq) = K_d \cdot C_{aq}^{ads}(eq)$.

▼B

A figura 1 apresenta as razões solo/solução necessárias em função de K_d, para diversos níveis de adsorção. Por exemplo, com uma razão solo/solução de 1:5 e um K_d de 20, a percentagem de adsorção será da ordem de 80 %. Para obter uma percentagem de adsorção de 50 %, com um idêntico valor de K_d, deve utilizar-se uma razão de 1:25. Esta abordagem de selecção das razões solo/solução adequadas fornece ao investigador a flexibilidade necessária à satisfação das exigências experimentais.

As zonas de abordagem analítica mais difícil são aquelas em que a substância apresenta uma adsorção ligeira ou bastante elevada. Em caso de adsorção reduzida, recomenda-se a utilização de uma razão solo/solução de 1:1, embora, para solos com elevado teor de matéria orgânica, possa revelar-se necessário utilizar razões inferiores, de modo a obter uma massa pastosa. Devem adoptar-se precauções com a metodologia analítica para a determinação de pequenas alterações de concentração, sem o que o cálculo da adsorção será inexacto. Por outro lado, no caso de coeficientes de partição K_d bastante elevados, pode utilizar-se uma razão solo/solução de 1:100, de modo a que permaneça na solução uma quantidade apreciável da substância. Contudo, devem adoptar-se precauções no sentido de assegurar uma homogeneização adequada, devendo prever-se o tempo necessário ao equilíbrio do sistema. A previsão do valor de K_d por recurso a técnicas de estimativa baseadas, por exemplo, nos valores de P_{ow} (apêndice 3) constitui uma abordagem alternativa, que pode ser utilizada, nomeadamente, no caso de substâncias polares ou com adsorção reduzida, bem como com valores de P_{ow} inferiores a 20, e no caso de substâncias lipófilas/ou de elevada adsorção com $P_{ow} > 10^4$.

1.9. REALIZAÇÃO DO ENSAIO

1.9.1. Condições de ensaio

Todos os ensaios devem ser realizados à temperatura ambiente e, se possível, a uma temperatura constante compreendida entre 20 °C e 25 °C.

As condições de centrifugação devem permitir remover da solução partículas de granulometria superior a 0,2 μm. Este valor representa a granulometria mínima para que uma partícula seja considerada sólida, constituindo o limite entre as partículas sólidas e coloidais. O apêndice 4 fornece directrizes para a determinação das condições de centrifugação.

Se o equipamento de centrifugação não garantir a remoção de partículas de granulometria superior a 0,2 μm, pode combinar-se a centrifugação com uma filtração com filtros de 0,2 um de porosidade. Os filtros devem ser feitos de um material inerte adequado, de modo a evitar quaisquer perdas da substância em estudo. Em qualquer caso, deve provar-se a não ocorrência de perdas da substância durante a filtração.

1.9.2. **Etapa 1 — Ensaio preliminar**

O objectivo da realização de um ensaio preliminar foi já referido na secção «Âmbito». Fornecem-se de seguida directrizes para o estabelecimento das condições do referido ensaio.

1.9.2.1. *Selecção das razões solo/solução adequadas*

Utilizam-se dois tipos de solos e três razões solo/solução (seis ensaios). Um dos tipos de solos deverá possuir um teor elevado de carbono orgânico e um teor reduzido de argila; o outro solo deverá possuir um teor reduzido de carbono orgânico e um elevado teor de argila. Recomendam-se as seguintes razões:

— 50 g de solo e 50 cm^3 de solução aquosa da substância em estudo (razão 1/1),

▼B

— 10 g de solo e 50 cm^3 de solução aquosa da substância em estudo (razão 1/5),

— 2 g de solo e 50 cm^3 de solução aquosa da substância em estudo (razão 1/25).

A quantidade mínima de solo necessária para efectuar o ensaio depende das condições laboratoriais e do desempenho dos métodos analíticos utilizados. Recomenda-se, contudo, a utilização de, pelo menos, 1 g, e, de preferência, 2 g, de modo a obter resultados fiáveis.

Uma amostra de controlo, contendo a substância em estudo dissolvida na solução de $CaCl_2$ 0,01 M, na ausência de solo, é sujeita ao mesmo tratamento que os sistemas de ensaio, com o objectivo de verificar a estabilidade da substância em estudo na solução de $CaCl_2$, bem como a sua eventual adsorção na superfície dos recipientes de ensaio.

Deve efectuar-se um ensaio em branco para cada tipo de solo, aplicando um procedimento idêntico a uma amostra constituída pela mesma quantidade de solo e um volume total de 50 cm^3 de solução de $CaCl_2$ 0,01 M, na ausência da substância em estudo. O ensaio em branco possui uma função de controlo do processo analítico, permitindo detectar a presença de substâncias interferentes ou de contaminantes dos solos.

Todos os ensaios, incluindo os de controlo e brancos, devem ser realizados pelo menos em duplicado. O número total de amostras a preparar para o ensaio pode ser calculado em função da metodologia utilizada.

Os métodos utilizados no ensaio preliminar e no ensaio principal são, de modo geral, idênticos, referindo-se as excepções sempre que for caso disso.

Antes da realização do ensaio, as amostras de solos secas ao ar são equilibradas por agitação, durante 12 h, com um volume mínimo de 45 cm^3 de $CaCl_2$ 0,01 M. Seguidamente, adiciona-se um volume determinado de solução-mãe da substância em estudo, de modo a ajustar o volume final para 50 cm^3. O volume de solução-mãe a adicionar: a) não deve exceder 10 % do volume final (50 cm^3) da fase aquosa, de modo a alterar tão pouco quanto possível a natureza da solução de pré-equilíbrio: b) deve, de preferência, resultar numa concentração inicial da substância em estudo em contacto com o solo (C_0) superior ao limite de detecção do método analítico em, pelo menos, duas ordens de grandeza; este limiar garante a possibilidade de efectuar determinações rigorosas mesmo em caso de ocorrência de uma forte adsorção (> 90 %), bem corno o cálculo posterior das isotérmicas de adsorção. Recomenda-se também, na medida do possível, que a concentração inicial da substância em estudo (C_0) não exceda metade do seu limite de solubilidade.

Apresenta-se de seguida um exemplo do cálculo da concentração da solução-mãe (C_{st}). Assume-se que o limite de detecção é de 0,01 µg cm^{-3} e a taxa de adsorção de 90 %; nestas condições, a concentração inicial da substância em estudo em contacto com o solo deve, preferentemente, ser de 1 µg cm^{-3} (superior ao limite de detecção em duas ordens de grandeza). Supondo que se adiciona o volume máximo recomendável de solução-mãe, isto é, 5 a 45 cm^3 de solução de $CaCl_2$ 0,01 M (= 10 % de solução-mãe a um volume total da fase aquosa de 50 cm^3), a concentração da solução-mãe deve ser de 10 µg cm^{-3}, ou seja, superior ao limite de detecção do método analítico em três ordens de grandeza.

Deve determinar-se o pH da fase aquosa antes e após o contacto com o solo. uma vez que desempenha um papel importante em todo o processo de adsorção, especialmente no caso das substâncias ionizáveis.

▼B

A mistura é agitada até ser atingido o equilíbrio de adsorção. O tempo necessário para atingir o equilíbrio no solo é bastante variável, dependendo da natureza da substância e do tipo de solo; um período de 24 h é, em geral, suficiente (77). No estudo preliminar, recomenda-se a adopção de uma amostragem sequencial nas 48 h subsequentes à mistura (por exemplo, após quatro, oito, 24 e 48 h). Deve, contudo, adoptar-se uma relativa flexibilidade no que respeita à duração do ensaio, tendo em conta a programação do trabalho de laboratório.

Existem duas opções para a análise da substância em estudo na solução aquosa: a) método paralelo b) método sequencial. Deve sublinhar-se que, embora no plano experimental o método paralelo seja mais fastidioso, o tratamento matemático dos resultados é mais simples (ver apêndice 5). Todavia, a escolha da metodologia a adoptar é deixada ao critério do experimentador, que deverá ter em conta as condições e os recursos laboratoriais disponíveis.

a) Método paralelo: preparam-se amostras com a mesma razão solo/solução, em número igual aos intervalos de tempo em que pretende estudar-se a cinética de adsorção. Após centrifugação e, se necessário, filtração, a fase aquosa do primeiro tubo é recolhida tão completamente quanto possível e sujeita a análise após, por exemplo, quatro h, sendo a fase aquosa do segundo tubo recolhida após oito h, a do terceiro tubo após 24, etc.;

b) Método sequencial: prepara-se uma única amostra em duplicado por cada razão solo/solução. A mistura é centrifugada a intervalos regulares, de modo a separar as fases. Determina-se de imediato a substância em estudo numa pequena alíquota da fase aquosa, prosseguindo-se o ensaio com a mistura original. Caso se recorra à filtração após a centrifugação, as condições do laboratório devem permitir filtrar alíquotas aquosas de volume reduzido. Recomenda-se que o volume total de alíquotas recolhidas não exceda 1 % do volume total da solução, de modo a não alterar significativamente a razão solo/solução e reduzir a massa de soluto disponível para adsorção durante o ensaio.

Calcula-se a percentagem de adsorçãoA_{t_i} em cada instante (t_i) com base na concentração inicial nominal e na concentração determinada no instante de amostragem (t_j), corrigida do valor referente à amostra em branco. A representação gráfica A, em função! do tempo (figura 1 do apêndice 5) permite obter uma estimativa do tempo necessário para atingir o patamar de equilíbrio ([1]), bem como calcular o valor de K_d no estado de equilíbrio. Com base no valor de K_d, seleccionam-se da figura 1 razões solo/solução adequadas, que determinem uma percentagem de adsorção superior a 20 % e, preferentemente, superior a 50 % (61). As equações a aplicar e princípios de representação gráfica são fornecidos na secção «Apresentação dos resultados» e no apêndice 5.

1.9.2.2. *Determinação do tempo necessário para atingir o equilíbrio de adsorção e da quantidade de substância em estudo adsorvida no estado de equilíbrio*

Como referido *supra*, a representação gráfica deA_{t_i} ou$\left(C_{aq}^{ads}\right)$ em função do tempo permite obter uma estimativa do instante em que é atingido o equilíbrio de adsorção, bem como da quantidade de substância em estudo adsorvida no estado de equilíbrio. As figuras 1 e 2 do apêndice 5 fornecem exemplos das referidas representações. O tempo necessário para atingir o equilíbrio traduz-se no tempo de que o sistema necessita para atingir o patamar de equilíbrio.

([1]) A representação gráfica da concentração da substância de ensaio na fase aquosa ($\left(C_{aq}^{ads}\right)$) em função do tempo pode também ser utilizada na estimativa do instante em que é atingido o patamar de equilíbrio (ver figura 2 do apêndice 5).

▼B

Se, no caso de um determinado solo, não se observar a ocorrência de qualquer patamar, mas antes um aumento constante, tal facto pode ser devido a factores de perturbação tais como a biodegradação ou difusão lenta. Pode averiguar-se a ocorrência de biodegradação repetindo o ensaio com uma amostra de solo esterilizada. Caso não se observe também qualquer patamar, o experimentador deve averiguar a ocorrência de outro fenómeno possível no caso específico em questão, procedendo a alterações adequadas das condições experimentais (temperatura, tempos de agitação, razões solo/solução). Compete ao experimentador decidir o prosseguimento do ensaio apesar da eventual impossibilidade de atingir o equilíbrio.

1.9.2.3. *Adsorção na superfície do recipiente de ensaio e estabilidade da substância em estudo*

A análise das amostras de controlo permite obter informações sobre a adsorção da substância em estudo na superfície dos recipientes de ensaio, bem como sobre a respectiva estabilidade. Caso se observe uma perda superior ao erro-padrão do método analítico utilizado, esta pode dever-se a uma degradação abiótica e/ou adsorção na superfície do recipiente de ensaio. Estes fenómenos são distinguíveis mediante a lavagem das paredes do recipiente com um volume conhecido de um solvente adequado, seguida de determinação da substância em estudo na solução resultante da lavagem. Se não ocorrer adsorção na superfície do recipiente de ensaio, a perda reflecte a instabilidade abiótica da substância em estudo. Caso se observe a ocorrência de adsorção, é necessário utilizar recipientes de outro material. De referir que os dados relativos à adsorção na superfície dos recipientes de ensaio assim obtidos não são directamente extrapoláveis para o ensaio solo/solução, uma vez que a presença de solo afecta o processo de adsorção.

Podem obter-se informações adicionais sobre a estabilidade da substância em estudo através do cálculo do balanço de massas em função do tempo. Tal implica a determinação da substância em estudo na fase aquosa, em extractos do solo e nas paredes do recipiente de ensaio. A diferença entre a massa de substância em estudo adicionada e a soma das massas da mesma substância na fase aquosa, nos extractos de solo e no recipiente de ensaio corresponde à massa degradada e/ou volatilizada e/ou não extraída. A determinação do balanço de massas apenas deve ser efectuada se o equilíbrio de adsorção tiver sido atingido no período de ensaio.

O balanço de massas é determinado para ambos os solos, bem como para uma razão solo/solução por solo com uma perda superior a 20 % e, preferentemente, superior a 50 %, no estado de equilíbrio. Após a análise da última amostra de fase aquosa, decorridas 48 h do início do ensaio, as fases são separadas por centrifugação e eventualmente filtradas. A fase aquosa é recuperada na maior extensão possível, adicionando-se de seguida ao solo um solvente de extracção adequado, com um coeficiente de extracção mínimo de 95 %, de modo a extrair a substância em estudo. Recomenda-se a realização de duas extracções sucessivas. Determina-se então a quantidade de substância em estudo presente no solo e nos extractos dos recipientes, procedendo-se ao cálculo do balanço de massas (equação 10 da secção «Apresentação dos resultados»). Caso o referido balanço seja inferior a 90 %, a substância deve considerar-se instável no intervalo de duração do ensaio. Podem, contudo, prosseguir-se os estudos, tendo em devida conta a referida instabilidade; neste caso, recomenda-se a análise de ambas as fases no ensaio principal.

▼B

1.9.3. *Etapa 2 — Cinética de adsorção para uma determinada concentração da substância em estudo*

Utilizam-se cinco solos, seleccionados com base no quadro 1. É conveniente utilizar alguns dos solos (ou mesmo todos) utilizados no ensaio preliminar. Neste caso, não deverá repetir-se a etapa 2 para os solos utilizados no referido ensaio.

O tempo necessário para atingir o equilíbrio, a razão solo/solução, a massa da amostra de solo, o volume de fase aquosa em contacto com o solo e a concentração da substância em estudo na solução são seleccionados com base nos resultados do ensaio preliminar. De preferência, deve efectuar-se a análise após um tempo de contacto aproximado de duas, quatro, seis, oito (eventualmente também 10) e 24 h; caso os resultados dos ensaios de das razões mostrem que um determinado produto necessita de tempos de exposição superiores, o tempo de agitação pode ser aumentado para, no máximo, 48 h. O estabelecimento dos referidos tempos deve, contudo, ser encarado de modo flexível.

Cada ensaio com um tipo específico de solo e uma solução deve ser efectuado pelo menos em duplicado, de modo a permitir estimar a variância dos resultados. Deve também realizar-se em cada caso um ensaio em branco, utilizando uma massa de amostra de solo e um volume de solução de $CaCl_2$ 0,01 M idênticos aos utilizados no ensaio principal, na ausência da substância em estudo. Deve aplicar-se o mesmo procedimento de ensaio a uma amostra de controlo contendo apenas a substância em estudo dissolvida na solução de $CaCl_2$ 0,01 M, na ausência de solo, como medida de precaução contra factores imprevistos.

A percentagem de adsorção é calculada em cada instanteA_{t_i} e/ou em cada intervalo$A_{\Delta t_i}$ (de acordo com as necessidades), sendo representada graficamente em função do tempo. Calcula-se também o coeficiente de distribuição no equilíbrio, K_d, bem como o coeficiente de adsorção normalizado em relação ao carbono orgânico, K_{oc} (aplicável a substâncias orgânicas não polares).

Resultados do ensaio de cinética de adsorção

De modo geral, o valor linear de K_d é suficientemente preciso para descrever o comportamento do solo em termos de adsorção/dessorção (35) (78), constituindo uma expressão da mobilidade característica da substância no solo. Considera-se, por exemplo, que as substâncias com $K_d \leq 1\ cm^3\ g^{-1}$ apresentam uma mobilidade qualitativa apreciável. Além disso, MacCall *et al.* (16) desenvolveram um método de classificação da mobilidade com base nos valores de K_{oc}. Existem também sistemas de classificação da lixiviação baseados na relação entre K_{oc} e DT-50 ([1]) (32) (79).

Por outro lado, de acordo com os estudos de análise de erros (61), os valores de K_d inferiores a $0,3\ cm^3\ g^{-1}$ não podem ser estimados de forma rigorosa com base no decréscimo da concentração da fase aquosa, mesmo quando se utiliza a razão solo/solução mais favorável do ponto de vista da precisão, ou seja, 1:1. Neste caso, recomenda-se proceder à análise de ambas as fases (solo e solução).

([1]) DT-50: tempo necessário para a degradação de 50 % da substância em estudo.

▼B

Relativamente às observações *supra*, recomenda-se que o estudo do comportamento da substância no solo em termos de adsorção, bem como da sua mobilidade potencial, seja seguido da determinação das isotérmicas de adsorção de Freundlich para os sistemas que permitam uma determinação rigorosa de K_d através do protocolo experimental descrito no presente método. Essta determinação é possível caso o valor resultante da multiplicação de K_d pela razão solo/solução seja superior a 0,3, sempre que as determinações sejam baseadas no decréscimo de concentração da fase aquosa (método indirecto), ou superior a 0,1, quando se procede à análise de ambas as fases (método directo) (61).

1.9.4. *Etapa 3 — Isotérmicas de adsorção e cinética de dessorção/isotérmicas de dessorção*

1.9.4.1. Isotérmicas de adsorção

Utilizam-se cinco concentrações da substância em estudo, que deverão abranger, de preferência, duas ordens de grandeza; na selecção das referidas concentrações, devem ter-se em conta a solubilidade em água e as concentrações de equilíbrio resultantes. Para cada solo, deve utilizar-se ao longo de todo o ensaio a mesma razão solo/solução. O ensaio de adsorção é efectuado do modo descrito supra, embora a fase aquosa seja analisada uma única vez, após o tempo necessário para atingir o equilíbrio, estabelecido na etapa 2. Determinam-se as concentrações da solução no equilíbrio, calculando-se a quantidade adsorvida com base na perda da substância em estudo na solução ou pelo método directo. Representa-se graficamente a massa adsorvida por unidade de massa do solo em função da concentração de equilíbrio da substância em estudo (ver secção «Apresentação dos resultados»).

Resultados do ensaio para a determinação das isotérmicas de adsorção

De entre os diversos modelos matemáticos de adsorção propostos, a isotérmica de Freundlich constitui um dos mais frequentemente utilizados para descrever os processos de adsorção. As referências (41) (45) (80) (81) (82) fornecem informações mais pormenorizadas sobre a interpretação e importância dos modelos de adsorção.

Nota: Deve referir-se que a comparação dos valores de K_F (coeficiente de adsorção de Freundlich) de diversas substâncias apenas é possível se os referidos valores forem expressos nas mesmas unidades (83).

1.9.4.2. Cinética de dessorção

O objectivo do ensaio consiste em averiguar a reversibilidade ou irreversibilidade da adsorção de uma substância no solo, informação importante na medida em que o processo de dessorção desempenha um papel considerável no comportamento da substância no solo. Além disso, os dados de dessorção são utilizados na modelização por computador de processos de lixiviação e escoamento de substâncias dissolvidas. Caso se pretenda efectuar um estudo de dessorção, recomenda-se a aplicação do protocolo descrito *infra* a cada sistema relativamente ao qual foi possível efectuar uma determinação rigorosa de K_d no ensaio de cinética de adsorção precedente.

Tal como no estudo de cinética de adsorção, existem duas opções para efectuar o ensaio de cinética de dessorção: a) método paralelo; b) método sequencial. A selecção da metodologia a adoptar é deixada ao critério do experimentador, que deverá ter em conta as condições e os recursos laboratoriais disponíveis.

▼B

a) Método paralelo: para cada tipo de solo seleccionado para o ensaio de dessorção, preparam-se amostras com a mesma razão solo/solução em número igual ao número de intervalos de tempo em que pretende estudar-se a cinética de dessorção. Devem usar-se, de preferência, os intervalos de tempo do ensaio de cinética de adsorção; pode, contudo, prolongar-se de forma adequada o tempo total, de modo a permitir que o sistema atinja o equilíbrio de dessorção. Deve efectuar-se um ensaio em branco para cada tipo de solo e concentração da solução, utilizando uma massa de solo e um volume de solução de $CaCl_2$ 0,01 M idênticos aos do ensaio principal, na ausência da substância em estudo. Deve ainda aplicar-se o mesmo procedimento de ensaio a uma amostra de controlo contendo apenas a substância em estudo dissolvida na solução de $CaCl_2$ 0,01 M, na ausência de solo. Agitam-se as misturas solo-solução até atingir o equilíbrio de adsorção, como determinado na etapa 2. Procede-se de seguida à separação das fases por centrifugação, recolhendo as fases aquosas na maior extensão possível. Os volumes de solução recolhidos são substituídos por iguais volumes de $CaCl_2$ 0,01 M, na ausência de substância em estudo, agitando de novo. Removem-se as fases aquosas de modo tão completo quanto possível, efectuando-se determinações após, por exemplo, duas h, no caso do primeiro tubo, quatro h no caso do segundo, seis h no caso do terceiro, etc. até atingir o equilíbrio de dessorção;

b) Método sequencial: após o ensaio de cinética de adsorção, a mistura é centrifugada e a fase aquosa remo vida na maior extensão possível. O volume de solução removida é substituído por igual volume de $CaCl_2$ 0,01 M, na ausência da substância em estudo. A nova mistura é agitada até atingir o equilíbrio de dessorção. Durante este período, procede-se à centrifugação da mistura a intervalos regulares, de modo a separar as fases. Determina-se de imediato a substância em estudo numa pequena alíquota da fase aquosa, prosseguindo o ensaio com a mistura original. O volume de cada alíquota recolhida deve ser inferior a 1 % do volume total. Adiciona-se à mistura uma quantidade igual de solução de $CaCl_2$ 0,01 M, com o objectivo de manter a razão solo/solução, mantendo a agitação até ao próximo intervalo.

Calcula-se a percentagem de dessorção em cada instante ((D_{t_i})) e/ou intervalo ($(D_{\Delta t_i})$) (de acordo com o objectivo do estudo), representando-a graficamente em função do tempo. Calcula-se também o coeficiente de dessorção no equilíbrio, K_{des}. As equações a aplicar são fornecidas na secção «Apresentação dos resultados» e no apêndice 5.

Resultados do ensaio de cinética de dessorção

A representação gráfica da percentagem de dessorçãoD_{t_i} e adsorçãoA_{t_i} em função do tempo permite estimar a reversibilidade do processo de adsorção. Caso o equilíbrio de dessorção seja atingido, mesmo num tempo duplo do tempo de equilíbrio de adsorção, e a dessorção total seja superior a 75 % da quantidade adsorvida, o processo de adsorção é considerado reversível.

1.9.4.3. Isotérmicas de dessorção

As isotérmicas de dessorção de Freundlich são determinadas nos solos utilizados no ensaio das isotérmicas de adsorção. O ensaio de dessorção é efectuado em conformidade com o protocolo descrito na secção «Cinética de dessorção», com a única diferença de que a fase aquosa é analisada uma única vez, no estado de equilíbrio de dessorção. Calcula-se a quantidade de substância em estudo dessorvida, representando graficamente o teor de substância em estudo que permanece adsorvida no solo no estado de equilíbrio de dessorção em função da concentração de equilíbrio da substância em estudo na solução (ver a secção «Apresentação dos resultados» e o apêndice 5).

▼B

2. **APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS**

Os dados analíticos são apresentados na forma de quadro (ver apêndice 6). Deve fornecer-se os resultados das várias determinações e as médias calculadas, bem como as representações gráficas das isotérmicas de adsorção. Os cálculos são efectuados do modo descrito *infra.*

Para os fins do ensaio, considera-se que 1 cm^3 de solução aquosa possui a massa de 1 g. Deste modo, a razão solo/solução pode ser expressa em massa/massa ou massa/volume com o mesmo valor numérico.

2.1. ADSORÇÃO

A adsorção (A_{t_i}) é definida como a percentagem de substância adsorvida no solo, relativamente à quantidade presente no início do ensaio e nas condições em causa. Caso a substância em estudo seja estável e não ocorra uma adsorção significativa nas paredes do recipiente, o valor deA_{t_i} em cada instante t_i é calculado através da equação:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{ads}(t_i) \cdot 100}{m_0} (\%) \qquad (3)$$

em que:

A_{ti} = percentagem de adsorção no instante t_i (%);

$m_s^{ads}(t_i)$ = massa de substância em estudo adsorvida no solo no instante t_i (μg);

m_0 = massa de substância em estudo presente no recipiente de ensaio, no início do mesmo (μg).

O apêndice 5 fornece informações pormenorizadas sobre o modo de cálculo da percentagem de adsorçãoA_{t_i} tanto no caso do método paralelo corno do método sequencial.

O coeficiente de distribuição K_d é a razão entre o teor de substância na fase edáfica e a concentração mássica da mesma na solução aquosa ao atingir o equilíbrio de adsorção, nas condições de ensaio.

$$K_d = \frac{C_s^{ads}(eq)}{C_{aq}^{ads}(eq)} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{aq}^{ads}(eq)} \cdot \frac{V_0}{m_{soil}} (cm^3\ g^{-1}) \qquad (4)$$

em que:

$C_s^{ads}(eq)$ = teor de substância adsorvida no solo no estado de equilíbrio de adsorção (μg g^{-1});

$C_{aq}^{ads}(eq)$ = concentração mássica da substância na fase aquosa no estado de equilíbrio de adsorção (μg cm-^{3}), cuja determinação analítica tem em conta os valores obtidos nos ensaios em branco;

$m_s^{ads}(eq)$ = massa de substância adsorvida no solo no estado de equilíbrio de adsorção (μg);

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = massa de substância presente na solução, no estado de equilíbrio de adsorção (μg);

m_{solo} = quantidade de fase edáfica, expressa em massa seca de solo (g);

V_0 = volume inicial de fase aquosa em contacto com o solo (cm^3).

A relação entre A_{eq} e K_d é dada por:

$$K_d = \frac{A_{eq}}{100 - A_{eq}} \cdot \frac{V_0}{m_{soil}} (cm^3\ g^{-1}) \qquad (5)$$

▼B

em que:

A_{eq} = percentagem de adsorção no estado de equilíbrio de adsorção, %.

O coeficiente de adsorção normalizado relativo ao carbono orgânico K_{oc} exprime o coeficiente de distribuição K_d em função do teor de carbono orgânico da amostra de solo:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%OC} (cm^3\ g^{-1}) \quad (6)$$

em que:

%OC = percentagem de carbono orgânico na amostra de solo (g g^{-1}).

O coeficiente K_{oc} constitui um parâmetro característico da partição do carbono orgânico entre o solo ou sedimento e a água, nomeadamente no caso de compostos orgânicos não polares. Existe uma correlação entre a adsorção das referidas substâncias e o teor de carbono orgânico do sólido adsorvente (7); os valores de K_{nc} dependem das características específicas das fracções húmicas cuja capacidade de adsorção diferem de modo considerável, devido, nomeadamente, à sua origem ou génese diversa.

2.1.1. **Isotérmicas de adsorção**

A equação que exprime as isotérmicas de adsorção de Freundlich relaciona a quantidade de substância em estudo adsorvida com a concentração da substância em estudo na solução, no estado de equilíbrio (equação 8).

Os dados são processados de modo idêntico ao descrito na secção «Adsorção», calculando-se, para cada recipiente de ensaio, o teor de substância em estudo adsorvida no solo após o ensaio de adsorção [$C_s^{ads}(eq)$, por vezes designado por x/m]. Presume-se que o equilíbrio foi atingido e que$C_s^{ads}(eq)$ representa o valor no estado de equilíbrio:

$$C_s^{ads}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{soil}} = \frac{\left[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)\right].V_0}{m_{soil}} (\mu g\ g^{-1}) \quad (7)$$

A equação de adsorção de Freundlich é dada por (8):

$$C_s^{ads}(eq) = K_F^{ads}.C_{aq}^{ads}(eq)^{1/n} (\mu g\ g^{-1}) \quad (8)$$

ou, na forma linear:

$$\log C_s^{ads}(eq) = \log K_F^{ads} + 1/n \cdot \log C_{aq}^{ads}(eq) \quad (9)$$

em que:

K_F^{ads} = Coeficiente de adsorção de Freundlich, cujas dimensões são de $cm^3\ g^{-1}$ apenas nos casos em que l/n = 1: em todos os restantes casos, o declive l/n é introduzido na dimensão deK_F^{ads} ($\mu g^{1-1/n}\ (cm^3)^{1/n}\ g^{-1}$);

n = constante de regressão; l/n situa-se, de modo geral, entre 0,7 e 1,0, mostrando que os dados de adsorção/dessorção são, com frequência, ligeiramente não lineares.

Aplicam-se as equações (8) e (9), sendo os valores deK_F^{ads} e l/n calculados por regressão linear, com o auxílio da equação 9. Calcula-se também o coeficiente de correlação r^2 da equação logarítmica. A figura 2 fornece um exemplo das representações em causa.

▼B

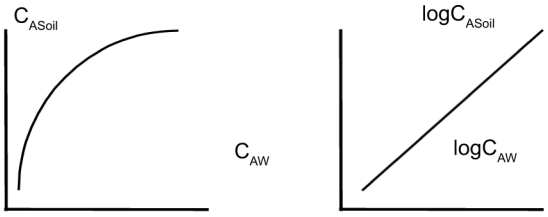


Figura 2. Gráficos de adsorção de Freundlich (normal e linearizado)

2.1.2. **Balanço de massas**

O balanço de massas (MB) é definido como a percentagem de substância inicialmente presente que pode ser analiticamente recuperada na sequência de um ensaio de adsorção.

O tratamento dos dados é diferente no caso de solventes totalmente miscíveis em água, podendo aplicar-se o método descrito na secção «Dessorção» para determinar a quantidade de substância recuperada por extracção com solvente. Se o solvente for menos miscível em água, deve determinar-se a quantidade recuperada.

O balanço de massas MB do processo de adsorção é calculado do modo que se segue; assume-se que o termo (m_E) corresponde à soma das massas da substância em estudo extraídas do solo e das paredes do recipiente de ensaio com um solvente orgânico:

$$MB = \frac{\left(V_{rec} \cdot C_{aq}^{ads}(eq) + m_E\right) \cdot 100}{V_0 \cdot C_0}\ (\%) \qquad (10)$$

em que:

MB = balanço de massas (%);

m_L = massa total de substância em estudo extraída do solo e das paredes do recipiente de ensaio em duas etapas (μg);

C_0 = concentração inicial da solução de ensaio em contacto com o solo (μg cm^{-3}):

V_{rec} = volume de sobrenadante recuperado após atingir o equilíbrio de adsorção (cm^{-3}).

2.2. DESSORÇÃO

A dessorção (D) é definida como a percentagem dessorvida de substância em estudo, relativamente à quantidade previamente adsorvida, nas condições de ensaio:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100(\%) \qquad (11)$$

em que:

D_{ti} = percentagem de dessorção no instante t_i (%);

▼B

$m_{aq}^{des}(t_i)$ = massa de substância em estudo dessorvida do solo no instante t_i (μg);

$m_s^{ads}(eq)$ = massa de substância em estudo adsorvida no solo no estado de equilíbrio de adsorção (μg).

O apêndice 5 fornece directrizes para o cálculo da percentagem de dessorção D_{t^i} no caso dos métodos paralelo e sequencial.

O coeficiente de dessorção aparente (K_{des}) é a razão entre a quantidade de substância que permanece na fase edáfica e a concentração mássica da substância dessorvida na solução aquosa, ao atingir o estado de equilíbrio de dessorção, nas condições de ensaio:

$$K_{des} = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{aq}^{des}(eq)} \frac{V_T}{m_{soil}} (cm^3\ g^{-1}) \quad (12)$$

em que:

K_{des} = coeficiente de dessorção ($cm^3\ g^{-1}$);

$m_{aq}^{des}(eq)$ = massa total de substância em estudo dessorvida do solo no estado de equilíbrio de dessorção (μg);

V_t = volume total da fase aquosa em contacto com o solo durante o ensaio de cinética de dessorção (cm^3).

A secção «Dessorção» do apêndice 5 fornece directrizes para o cálculo de $m_{aq}^{des}(eq)$.

Nota:

Caso o ensaio de adsorção precedente tenha sido efectuado pelo método paralelo, considera-se que o volume V_T da equação (12) é igual a V_0.

2.2.1. **Isotérmicas de dessorção**

A equação que exprime as isotérmicas de dessorção de Freundlich relaciona o teor de substância em estudo que permanece adsorvida no solo com a concentração de substância em estudo presente na solução no estado de equilíbrio de dessorção (equação 16).

Para cada recipiente de ensaio, o teor de substância que permanece adsorvida no solo no estado de equilíbrio de dessorção é calculado através da equação:

$$C_s^{des}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{soil}} (\mu g\ g^{-1}) \quad (13)$$

$m_{aq}^{des}(eq)$ é definida como:

$$m_{aq}^{des}(eq) = m_m^{des}(eq) \cdot \frac{V_0}{V_r^F} - m_{aq}^{A}(\mu g) \quad (14)$$

em que:

$C_s^{des}(eq)$ = teor de substância em estudo que permanece adsorvida no solo no estado de equilíbrio de dessorção (μg g^{-1}):

$m_m^{des}(eq)$ = massa de substância determinada analiticamente na fase aquosa, no estado de equilíbrio de dessorção (μg);

▼B

m_{aq}^{A} = massa de substância em estudo remanescente do equilíbrio de adsorção devido a uma substituição incompleta de volumes (μg);

$m_{aq}^{des}(eq)$ = massa de substância na solução no estado de equilíbrio de adsorção (μg);

$$m_{aq}^{A} = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0}\right) \quad (15)$$

V_r^F = volume de solução recolhido do recipiente para determinação da substância em estudo, no estado de equilíbrio de dessorção (cm^3);

V_R = volume de sobrenadante removido do tubo ao atingir o estado de equilíbrio de adsorção e substituído pelo mesmo volume de solução de $CaCl_2$ 0,01 M (cm^3);

A equação de dessorção de Freundlich é dada por (16):

$$C_s^{des}(eq) = K_F^{des} \cdot C_{aq}^{des}(eq)^{1/n} (\mu g\ g^{-1}) \quad (16)$$

ou, na forma linear:

$$\log C_s^{des}(eq) = \log K_F{}^{des} + 1/n \cdot \log C_{aq}{}^{des}(eq) \quad (17)$$

em que:

K_F^{des} = coeficiente de dessorção de Freundlich;

n = constante de regressão;

$C_{aq}^{des}(eq)$ = concentração mássica da substância na fase aquosa, no estado de equilíbrio de dessorção (μg cm^{-3}).

As equações (16) e (17) podem ser representadas graficamente, calculando-se os valores de $K_F{}^{des}$ e l/n por regressão linear, através da equação 17.

Nota:

Caso o expoente l/n da equação de adsorção ou dessorção de Freundlich seja unitário, a constante de adsorção ou dessorção de Freundlich (K_F^{ads} e K_F^{des}) é igual à constante de equilíbrio de adsorção ou dessorção (K_d e $K_{des)}$, respectivamente, sendo lineares as representações de C_s em função de C_{aq}. Caso os referidos expoentes sejam diferentes de 1, a representação de C_s *versus* C_{aq} será não linear, variando as constantes de adsorção e dessorção ao longo das isotérmicas.

2.2.2. **Relatório do ensaio**

O relatório do ensaio deverá incluir as seguintes informações:

— Identificação completa das amostras de solo utilizadas, incluindo:

— identificação geográfica do local (latitude, longitude),

— data de recolha das amostras,

▼B

— perfil de utilização do solo (por exemplo, solo agrícola, florestal, etc.),

— profundidade da recolha de amostras,

— teor de areia/sedimentos/argila,

— valores de pH (em solução de $CaCl_2$ 0,01 M),

— teor de carbono orgânico,

— teor de matéria orgânica,

— teor de azoto,

— razão C/N,

— capacidade de permuta catiónica (mmol/kg),

— todas as informações relativas à recolha e armazenagem das amostras de solo,

— se adequado, quaisquer informações relevantes para a interpretação dos processos de adsorção-dessorção da substância em estudo,

— referência aos métodos utilizados para a determinação de cada parâmetro,

— informações adequadas sobre a substância em estudo,

— temperatura de ensaio,

— condições de centrifugação,

— processo analítico utilizado para a análise da substância em estudo,

— justificação do eventual recurso a um agente de solubilização na preparação da solução-mãe da substância em estudo,

— explicação das correcções efectuadas nos cálculos, se for caso disso,

— dados apresentados em conformidade com o formulário do apêndice 6 e representações gráficas,

— quaisquer informações e observações úteis para a interpretação dos resultados do ensaio.

3. **REFERÊNCIAS**

(1) Kukowski H. and Brümmer G., (1987). Investigations on the Adsorption and Desorption of Selected Chemicals in Soils. UBA Report 106 02045, Part II.

(2) Fränzle O., Kuhnt G. and Vetter L., (1987). Selection of Representative Soils in the EC-Territory. UBA Report 106 02045, Part I.

(3) Kuhnt G. and Muntau H. (Eds.) EURO-Soils: Identification, Collection, Treatment, Characterisation. Special Publication No 1.94.60, Joint Research Centre. European Commission, ISPRA, December 1994.

(4) OECD Test Guidelines Programme, Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18--20 January 1995 (June 1995).

(5) US Environment Protection Agency: Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N, Chemistry: Environmental Fate. Series 163-1, Leaching and Adsorption/Desorption Studies, Addendum 6 on Data Reporting, 540/09-88-096, Date: 1/1988.

▼B

(6) US Environment Protection Agency: Prevention, Pesticides and Toxic Substances, OPPTS Harmonized Test Guidelines, Series 835-Fate. Transport and Transformation Test Guidelines, OPPTS No: 835.1220 Sediment and Soil Adsorption/Desorption Isotherm. EPA No: 712-C-96-048, April 1996.

(7) ASTM Standards, E 1195-85, Standard Test Method for Determining a Sorption Constant (K_{oc}) for an Organic Chemical in Soil and Sediments.

(8) Agriculture Canada: Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada, 15 July 1987.

(9) Netherlands Commission Registration Pesticides (1995): Application for registration of a pesticide. Section G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

(10) Danish National Agency of Environmental Protection (October 1988): Criteria for registration of pesticides as especially dangerous to health or especially harmful to the environment.

(11) BBA (1990), Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, Biological Research Centre for Agriculture and Forestry, Braunschweig, Germany.

(12) Calvet R., (1989), «Evaluation of adsorption coefficients and the prediction of the mobilities of pesticides in soils», in Methodological Aspects of the Study of Pesticide Behaviour in Soil (ed. P. Jamet), INRA, Paris, (Review).

(13) Calvet R., (1980), «Adsorption-Desorption Phenomena» in Interactions between herbicides and the soil. (R. J. Hance ed.), Academic Press, London, p. 83-122.

(14) Hasset J. J., and Banwart W.L., (1989), The sorption of nonpolar organics by soils and sediments' in Reactions and Movement of Organic Chemicals in Soils. Soil Science Society of America (S.S.S.A), Special Publication no. 22, p. 31-44.

(15) van Genuchten M. Th., Davidson J. M., and Wierenga P. J., (1974), «An evaluation of kinetic and equilibrium equations for the prediction of pesticide movement through porous media». Soil Sci. Soc. Am. Proc., Vol. 38(1), p. 29-35.

(16) McCall P. J., Laskowski D. A., Swann R. L., and Dishburger H. J., (1981), «Measurement of sorption coefficients of organic chemicals and their use, in environmental fate analysis», in Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants. Proceedings of AOAC Symposium, AOAC, Washington DC.

(17) Lambert S. M, Porter P. E., and Schieferrstein R. H., (1965), «Movement and sorption of chemicals applied to the soil». Weeds, 13, p. 185-190.

(18) Rhodes R. C, Belasco L. J., and Pease H. L, (1970) «Determination of mobility and adsorption of agrochemicals in soils». J.Agric.Food Chem., 18, p. 524-528.

(19) Russell M. H., (1995), «Recommended approaches to assess pesticide mobility in soil» in Environmental Behavior of Agrochemicals (ed. T. R. Roberts and P. C. Kearney). John Wiley & Sons Ltd.

(20) Esser H. O., Hemingway R. J., Klein W., Sharp D. B., Vonk J. W. and Holland P. T., (1988), «Recommended approach to the evaluation of the environmental behavior of pesticides», IUPAC Reports on Pesticides (24). Pure Appl. Chem., 60, p. 901--932.

▼B

(21) Guth J. A., Burkhard N., and D. O. Eberle, (1976), «Experimental models for studying the persistence of pesticides in soils». Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, p. 137-157, BCPC, Surrey, UK.

(22) Furminge C. G. L., and Osgerby J. M., (1967), «Persistence of herbicides in soil». J. Sci. Fd Agric, 18, pp. 269-273.

(23) Burkhard N., and Guth J. A., (1981), «Chemical hydrolysis of 2-Chloro-4,6-bis(alkylamino)-l,3,5-triazine herbicides and their breakdown in soil under the influence of adsorption». Pestic. Sci. 12, p. 45-52.

(24) Guth J. A., Gerber H. R., and Schlaepfer T., (1977), «Effect of adsorption, movement and persistence on the biological availability of soil-applied pesticides». Proc. Br. Crop Prot. Conf., 3, p. 961-971.

(25) Osgerby J. M., (1973), «Process affecting herbicide action in soil». Pestic. Sci., 4, p. 247-258.

(26) Guth J. A., (1972), «Adsorptions- und Einwascheverhalten von Pflanzenschutzmitteln in Böden». Schr. Reihe Ver. Wass. -Boden-Lufthyg. Berlin-Dahlem, Heft 37, p. 143-154.

(27) Hamaker J. W., (1975), «The interpretation of soil leaching experiments», in Environmental Dynamics of Pesticides (eds R. Haque and V.H. freed), p. 1 3 5-1 72, Plenum Press, NY.

(28) Helling C. S., (1971), «Pesticide mobility in soils». Soil Sci. Soc. Amer. Proc, 35, p. 732-210.

(29) Hamaker J. W., (1972), «Diffusion and volatilization» in Organic chemicals in the soil environment (C.A.I. Goring and J. W. Hamaker eds). Vol. I, p. 49-143.

(30) Burkhard N. and Guth J. A., (1981), «Rate of volatilisation of pesticides from soil surfaces; Comparison of calculated results with those determined in a laboratory model system». Pestic. Sci. 12, p. 37-44.

(31) Cohen S. Z., Creeger S. M., Carsel R.F., and Enfield C.G., (1984), «Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses», in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, p. 297-325, Acs Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.

(32) Gustafson D. I., (1989), «Groundwater ubiquity score: a simple method for assessing pesticide leachability». J. Environ. Toxic. Chem., 8(4), p. 339-357.

(33) Leistra M., and Dekkers W. A., (1976). «Computed effects of adsorption kinetics on pesticide movement in soils». J. of Soil Sci., 28, p. 340-350.

(34) Bromilov R. H., and Leistra M., (1980), «Measured and simulated behavior of aldicarb and its oxydation products in fallow soils». Pest. Sci., 11, p. 389-395.

(35) Green R. E., and Karickoff S. W., (1990), «Sorption estimates for modeling», in Pesticides in the Soil Environment: Process, Impacts and Modeling (ed. H.H. Cheng). Soil Sci. Soc. Am., Book Series no. 2, p. 80-101,

(36) Lambert S. M., (1967), «Functional relationship between sorption in soil and chemical structure». J. Agri. Food Chem., 15, p. 572-576.

▼B

(37) Hance R. J., (1969), «An empirical relationship between chemical structure and the sorption of some hcrbicides by soils». J. Agri. Food Chem., 17, p. 667-668.

(38) Briggs G. G. (1969), «Molecular structure of herbicides and their sorption by soils». Nature, 223, 1288.

(39) Briggs G. G. (1981). Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor'. J. Agric. Food Chem., 29, p. 1050-1059.

(40) Sabljic A., (1984), «Predictions of the nature and strength of soil sorption of organic polutance by molecular topology». J. Agric. Food Chem., 32, p. 243-246.

(41) Bailey G. W., and White J. L., (1970), «Factors influencing the adsorption, desorption, and movement of pesticides in soil». Residue Rev., 32, p. 29-92.

(42) Bailey G. W., J. L.. White and Y. Rothberg., (1968), «Adsorption of organic herbicides by montomorillonite: Role of pH and chemical character of adsorbate». Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 32: p. 222-234.

(43) Karickhoff S. W., (1981), «Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils». Chemosphere 10, p. 833-846.

(44) Paya-Perez A., Riaz M. and Larsen B., (1989), «Soil Sorption of 6 Chlorobenzenes and 20 PCB Congeners». Environ. Toxicol. Safety 21, p. 1-17.

(45) Hamaker J. W., and Thompson J. M, (1972), «Adsorption in organic chemicals» in Organic Chemicals in the Soil Environment (Goring C.A.I. and Hamaker J.W., eds), Vol I and II, Marcel Dekker, Inc., New York, NY, 1972, p. 49-143.

(46) Deli J., and Warren G. F., 1971, «Adsorption, desorption and leaching of diphenamid in soils». Weed Sci. 19: p. 67-69.

(47) Chu-Huang Wu, Buehring N., Davinson J. M. and Santelmann, (1975), «Napropamide Adsorption, desorption and Movement in soils». Weed Science, Vol. 23, p. 454-457.

(48) Haues M. H. B., Stacey M., and Thompson J. M., (1968), «Adsorption of s-triazine herbicides by soil organic preparations» in Isotopes and Radiation in Soil Organic Studies, p. 75, International. Atomic Energy Agency, Vienna.

(49) Pionke H. B., and Deangelis R. J., (1980), «Methods for distributing pesticide loss in field run-off between the solution and adsorbed phase», CREAMS, in A Field Scale Model for Chemicals, Run-off and Erosion from Agricultural Management Systems, Chapter 19, Vol. III: Supporting Documentation, USDA Conservation Research report.

(50) ISO Standard Compendium Environment: Soil Quality — General aspects: chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition (1994).

(51) Scheffer F., and Schachtschabel, Lehrbuch der Bodenkunde, F. Enke Verlag, Stuttgart (1982), 11 th edition.

(52) Black, Evans D. D., White J. L, Ensminger L. E., and Clark F. E., eds. «Methods of Soil Analysis», Vol 1 and 2, American Society of Agronomy, Madison, WI, 1982.

▼B

(53) ISO/DIS 10381-1 Soil Quality — Sampling — Part 1: Guidance on the design of sampling programmes.

(54) ISO/DIS 10381-2 Soil Quality — Sampling — Part 2: Guidance on sampling techniques.

(55) ISO/DIS 10381-3 Soil Quality — Sampling — Part 3: Guidance on safety of sampling.

(56) ISO/DIS 10381-4 Soil Quality — Sampling — Part 4: Guidance on the investigation of natural and cultivated soils.

(57) ISO/DIS 10381-5 Soil Quality — Sampling — Part 5: Guidance on the investigation of soil contamination of urban and industrial sites.

(58) ISO 10381-6, 1993: Soil Quality — Sampling — Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(59) Green R. E., and Yamane V. K., (1970), «Precision in pesticide adsorption measurements». Soil Sci. Am. Proc, 34, p. 35 3-354.

(60) Grover R., and Hance R. J. (1970), «Effect of ratio of soil to water on adsorption of linuron and atrazine». Soil Sci., p. 109--138.

(61) Boesten, J. J. T. I, «Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in pesticide/soil system». Pest. Sci. 1990, 30, p. 31-41.

(62) Boesten, J. J. T. I. «Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in relation to OECD guideline 106». Proceedings of 5th international workshop on environmental behaviour of pesticides and regulatory aspects, Brussels, 26-29 April 1994.

(63) Bastide J. Cantier J. M, et Coste C. (1980), «Comportement de substances herbicides dans le sol en fonction de leur structure chimique». Weed Res. 21, p. 227-231.

(64) Brown D. S., and Flagg E. W., (1981), «Empirical prediction of organic pollutants sorption in natural sediments». J. Environ.Qual., 10(3), p. 382-386.

(65) Chiou C. T., Porter P. E., and Schmedding D. W., (1983), «Partition equilibria of non-ionic organic compounds between soil organic matter and water». Environ. Sei. Technol., 17(4), p. 227-231.

(66) Gerstl Z., and Mingelgrin U., (1984), «Sorption of organic substances by soils and sediments». J. Environm. Sci. Health, B19 (3), p. 297-312.

(67) Vowles P. D., and Mantoura R. F. C, (1987), «Sediment-water partition coefficient and HPLC retention factors of aromatic hydrocarbons». Chemosphere, 16(1), p. 109-116.

(68) Lyman W. J., Reehl W. F.and Rosenblatt D. H. (1990). Handbook of Chemical Property Estimation Methods. Environmental Behaviour of Organic Compounds. American Chemical Society, Washington DC.

(69) Keniga E. E., and Goring, C. A. I. (1980). «Relationship between water solubility, soil sorption, octanol-water partitioning and concentration of chemicals in the biota» in Aquatic Toxicology (eds J.G. Eaton, et al.), p. 78-115, ASTM STP 707, Philadelphia.

▼B

(70) Chiou C. T., Peters L. J., and Freed V. H., (1979), «A physical concept of soil-water equilibria for non-ionic organic compounds». Science, Vol. 206, p. 831-832.

(71) Hassett J. J., Banwart W. I., Wood S. G., and Means J. C., (1981), «Sorption of/-Naphtol: implications concerning the limits of hydrophobic sorption». Soil Sci. Soc. Am. J. 45, p. 38--42.

(72) Karickhoff S. W., (1981), «Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils». Chemosphere, Vol. 10(8), p. 8 3 3-846.

(73) Moreale A., van Bladel R., (1981), «Adsorption de 13 herbicides et insecticides par le sol. Relation solubilité-reactivité». Revue de l'Agric., 34 (4), p. 319-322.

(74) Müller M., Kördel W. (1996), «Comparison of screening methods for the determination/estimation of adsorption coefficients on soil». Chemosphere, 32(12), p. 2493-2504.

(75) Kördel W., Kotthoff G., Miiller M. (1995), «HPLC — screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil — results of a ring test». Chemosphere 30 (7), p. 1373--1384.

(76) Kördel W., Stutte J., Kotthoff G. (1993), «HPLC — screening method for the determination of the adsorption coefficicnt on soil — comparison of different stationary phases». Chemosphere 27 (12), p. 2341-2352.

(77) Hance, R. J., (1967), «The Speed of Attainment of Sorption Equilibria in Some Systems Involving Herbicides». Weed Research, Vol. 7, p. 29-36.

(78) Koskinen W. C, and Harper S. S., (1990), «The retention processes: mechanisms» in Pesticides in the Soil Environment: Processes, Impacts and Modelling (ed. H.H. Cheng). Soil Sci. Soc. Am. Book Series, No. 2, Madison, Wisconsin.

(79) Cohen S. Z., Creeger S. M., Carsel R. F., and Enfield C. G. (1984), «Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses», in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, p. 297-325, ACS Symp. Ser. 2 59, American Chemical Society, Washington, DC.

(80) Giles C. H., (1970), «Interpretation and use of sorption isotherms» in Sorption and Transport Processes in Soils. S.C.I. Monograph No. 37, p. 14-32.

(81) Giles, C. H.; McEwan J. H.; Nakhwa, S.N. and Smith, D, (1960). «Studies in adsorption: XI. A system of classification of solution adsorption isotherms and its use in the diagnosis of adsorption mechanisms and in measurements of pesticides surface areas of soils». J. Chem. Soc, p. 397 3-93.

(82) Calvet R., Tercé M., and Arvien J. C., (1980), «Adsorption des pesticides par les sols et leurs constituants: 3. Caractéristiques générales de 1'adsorption». Ann. Agron. 31: pp. 239-251.

(83) Bedbur E., (1996), «Anomalies in the Freundlich equation», Proc. COST 66 Workshop, Pesticides in soil and the environment, 13-15 May 1996, Stratford-upon-Avon, UK.

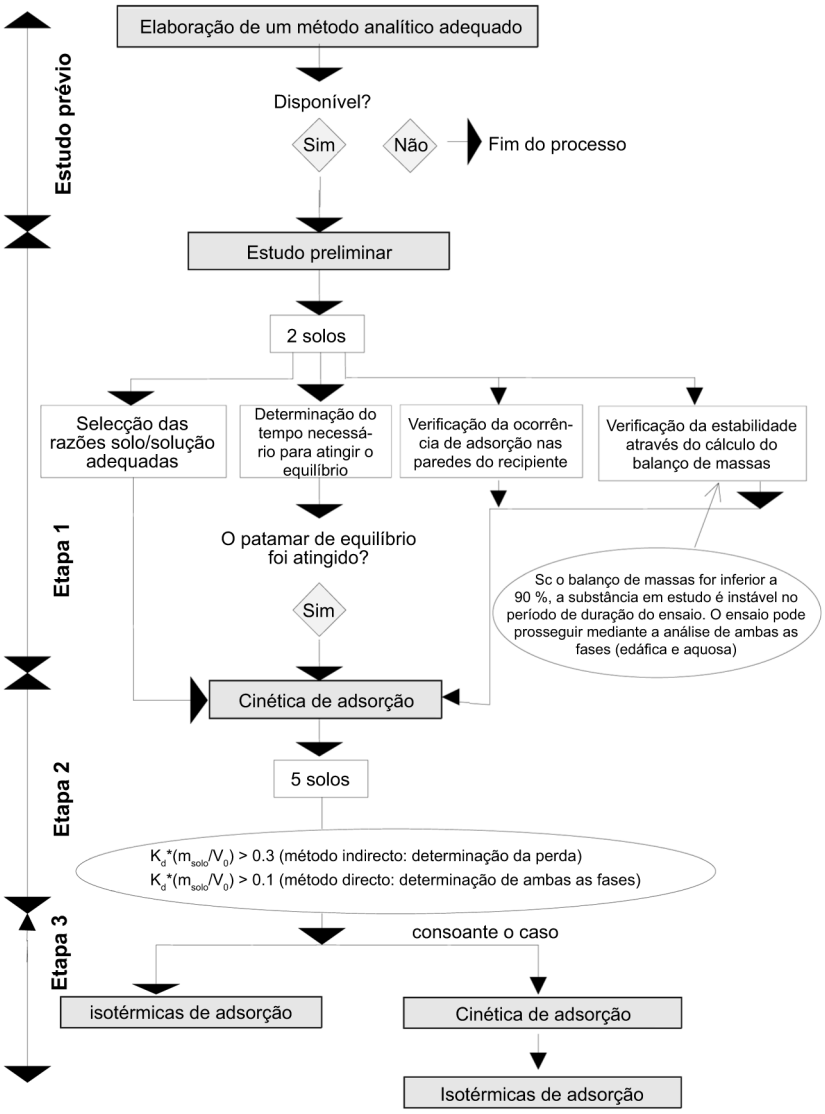
(84) Guth, J. A., (198 5), «Adsorption/desorption», in Joint International Symposium, Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment, July 1-3, Canterbury, UK.

(85) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).

▼B

Apêndice 1

Protocolo de ensaio



▼B

Apêndice 2

INFLUÊNCIA DO RIGOR DO MÉTODO ANALÍTICO E DAS ALTERAÇÕES DE CONCENTRAÇÃO NOS RESULTADOS DE ADSORÇÃO

A análise do quadro infra (84) torna evidente que, caso a diferença entre a massa inicial (m_0 = 110 µg) e a massa de equilíbrio ($m_{aq}^{ads}(eq)$ = 100 µg] da substância em estudo na solução seja bastante reduzida, um erro de 5 % na determinação da concentração de equilíbrio resulta num erro de 50 % no cálculo do teor de substância adsorvida no solo ($m_s^{ads}(eq)$ e de 52,4 % no cálculo de K_d.

Quantidade de solo m_{solo} = 10 g

Volume de solução V_0 =100 cm^3

	$m_{aq}^{ads}(eq)$ (µg)	$C_{aq}^{ads}(eq)$ (µg cm-^{3})	R	$m_s^{ads}(eq)$* (µg)	$C_s^{ads}(eq)$* (µg g^{-1})	R‡	K_d*	R‡
m_0 = 110 µg ou C_0=1,100 µg/cm^3	**A = 9 %**							
	100	1,000	valor real	10	1,00	valor real	1	
	101	1,010	1 %	9	0,90	10 %	0,891	10,9 %
	105	1,050	5 %	5	0,50	50 %	0,476	52,4 %
	109	1,090	9 %	1	0,10	90 %	0,092	90,8 %
m_0= 110 µg ou C_0=1,100µg/cm^3	**A = 55 %**							
	50,0	0,500	valor real	60,0	6,00	valor real	12,00	
	50,5	0,505	1 %	59,5	5,95	0,8 %	11,78	1,8 %
	52,5	0,525	5 %	57,5	5,75	4,0 %	10,95	8,8 %
	55,0	0,550	10 %	55,0	5,50	8,3 %	10,00	16,7 %
m_0 = 110 µg ou C_0=1,100 µg/cm^3	**A = 99 %**							
	1,100	0,011	valor real	108,9	10,89	valor real	990	
	1,111	0,01111	1 %	108,889	10,8889	0,01 %	980	1,0 %
	1,155	0,01155	5 %	108,845	10,8845	0,05 %	942	4,8 %
	1,21	0,0121	10 %	108,790	10,8790	0,10 %	899	9,2 %

onde:

$*m_s^{ads}(eq) = m_0 - m_{aq}^{ads}(eq), C_s^{ads}(eq) = \frac{\left[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)\right] V_0}{m_{soil}}. Kd = \frac{m_s^{ads}(eq)\ _{V_0}}{m_{aq}^{ads}(eq)^{m_{soil}}}$

$m_s^{ads}(eq)$ = massa da substância em estudo no solo, no estado de equilíbrio, µg

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = massa da substância em estudo na fase aquosa, no estado de equilíbrio, µg

$C_s^{ads}(eq)$ = teor da substância em estudo no solo, no estado de equilíbrio, µg g^{-1}

$C_{aq}^{ads}(eq)$ = concentração mássica da substância em estudo na fase aquosa, no estado de equilíbrio, µg cm-^{3}

R = erro analítico na determinação dem$_{aq}^{ads}(eq)$;

R‡ = erro calculado devido ao erro analítico R.

▼B

Apêndice 3

TÉCNICAS DE ESTIMATIVA DE K_D

1. O recurso a técnicas de estimativa permite prever o valor de K_d com base na correlação, nomeadamente com os valores de P_{ow} (12) (39) (63-68), solubilidade em água (12) (19) (21) (39) (68-73) ou polaridade decorrentes da análise por HPLC de fase reversa (74-76) Como se mostra nos quadros 1 e 2, os valores de K_{oc} e K_{om} são calculados com base nas equações que se seguem, sendo o valor de K_d determinado de forma indirecta:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%oc}\,(cm^3 g^{-1}) \qquad K_{om} = \frac{K_d}{1{,}724} \cdot \frac{100}{\%oc}\,(cm^3 g^{-1})$$

2. As referidas correlações baseiam-se em dois pressupostos: (1) o teor de matéria orgânica de um solo é o principal factor determinante da adsorção de uma substância nesse solo: (2) as interacções envolvidas são principalmente não polares. Em consequência, as referidas correlações: (1) não são aplicáveis, ou apenas são parcialmente aplicáveis, a substâncias polares: (2) não são aplicáveis aos casos em que o teor de matéria orgânica dos solos seja bastante reduzido (12). Além disso, embora seja possível obter correlações satisfatórias entre os valores de P_{ow} e da adsorção (19), o mesmo não sucede no que respeita à relação entre a solubilidade em água e a extensão da adsorção (19) (21): os estudos realizados até ao presente têm-se revelado bastante contraditórios.

3. Os quadros 1 e 2, respectivamente, fornecem alguns exemplos de correlações entre os coeficientes de adsorção e os coeficientes de partição octanol-água, bem como a solubilidade em água.

Quadro 1.

Exemplos de correlações entre o coeficiente de distribuição de adsorção e o coeficiente de partição octanol-água: para mais exemplos, ver as referências (12) (68)

Substâncias	Correlações	Autores
Diversos pesticidas	$\log K_{om} = 0{,}69 + 0{,}52 \log P_{ow}$	Briggs (1981) (39)
Compostos aromáticos clorados	$\log K_{oc} = - 0{,}779 + 0{,}904 \log P_{ow}$	Chiou *et al*. (1983) (65)
Diversos pesticidas	$\log K_{om} = 4{,}4 + 0{,}72 \log P_{ow}$	Gerstl e Mingelgrin (1984) (66)
Hidrocarbonetos aromáticos	$\log K_{oc} = - 2{,}53 + 1{,}15 \log P_{ow}$	Vowles e Mantoura (1987) (67)

Quadro 2.

Exemplos de correlações entre o coeficiente de distribuição de adsorção e a solubilidade em água; para mais exemplos, ver as referências (68) (69)

Substâncias	Correlações	Autores
Diversos pesticidas	$\log K_{om} = 3{,}8 - 0{,}561 \log S_w$	Gerstl e Mingelgrin (1984) (66)
Compostos alifáticos e aromáticos clorados	$\log K_{om} = (4{,}040 +/- 0{,}038) - (0{,}557 +/- 0{,}012) \log S_w$	Chiou *et al*. (1979) (70)
α-naphtol	$\log K_{oc} = 4{,}273 - 0{,}686 \log S_w$	Hasset et al. (1981) (71)
Compostos cíclicos (alifáticos e aromáticos	$\log K_{oc} = - 1{,}405 - 0{,}921 \log S_w - 0{,}00953$ (mp-25)	Karickhoff (1981) (72)
Diversas substâncias	$\log K_{om} = 2{,}75 - 0{,}45 \log S_w$	Moreale van Blade (1982) (73)

▼B

Apêndice 4

CÁLCULOS PARA A DEFINIÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CENTRIFUGAÇÃO

1. O tempo de centrifugação é dado pela seguinte fórmula, presumindo que as partículas possuem forma esférica:

$$t = \frac{9}{2}\left[\frac{\eta}{\omega^2 rp^2(\rho_s - \rho_{aq})}\right]\ln(R_b/R_t) \qquad (1)$$

Por motivos de simplificação, todos os parâmetros são apresentados em unidades não pertencentes ao SI (g, cm).

ω = velocidade angular (=2 π rpm/60), rad s^{-1};

rpm = rotações por minuto;

η = viscosidade da solução, g s^{-1} cm^{-1};

r_p = raio das partículas, cm;

p_s = densidade do solo, g cm^{-3};

p_{aq} = densidade da solução, g cm^{-3};

R_t = distância do centro do rotor da centrifugadora ao topo da solução no tubo de ensaio, cm;

R_b = distância do centro do rotor da centrifugadora à base do tubo de ensaio, cm;

R_b-R_t = altura da mistura solo/solução no tubo de ensaio, cm.

Na prática, devem utilizar-se tempos duplos dos calculados, de modo a garantir a separação completa.

2. A equação (1) pode ser simplificada, considerando que a viscosidade (η) e a densidade (p_{aq}) da solução são iguais à viscosidade e densidade da água a 25 °C; obtém-se, assim, n = 8,95 × 10^{-3} g s^{-1} cm^{-1} and p_{aq} = 1,0 g, cm^{-3}.

O tempo de centrifugação é dado pela fórmula (2):

$$t = \frac{3.7}{(rpm)^2 . r_p^2(\rho_s - 1)}\ln\frac{Rb}{Rt} \qquad (2)$$

3. A equação 2 mostra a importância de dois parâmetros, designadamente o tempo (t) e a velocidade (rpm), na definição das condições de centrifugação tendo cm vista a separação de partículas de dimensões específicas (no caso em estudo 0,1 um radianos): (1) a densidade do solo e (2) a altura da mistura no tubo de ensaio (R_b-R_t), ou seja, a distância entre o topo da solução e a base do tubo; como é óbvio, para um determinado volume, a altura da mistura no tubo depende do quadrado do respectivo raio.

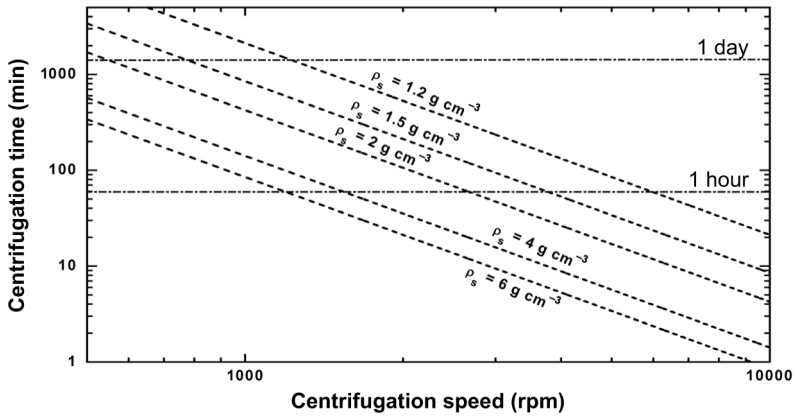
4. A figura 1 apresenta o gráfico da variação do tempo de centrifugação (t) em função da velocidade de centrifugação (rpm), para solos de densidades diversas (p_s) (fig. 1a) e diversas alturas da mistura nos tubos de ensaio (fig. lb). A figura 1a evidencia a influência da densidade do solo; por exemplo, para um perfil de centrifugação clássico de 3 000 rpm o tempo de centrifugação é da ordem de 240 minutos para um solo de 1,2 g cm^3 de densidade, sendo de apenas 50 minutos para uma densidade de 2,0 g cm^3. Do mesmo modo, a figura lb mostra que, para um perfil de centrifugação clássico de 3 000 rpm o tempo de centrifugação é de cerca de 50 minutos para uma altura da mistura de 10 cm e apenas 7 minutos para uma altura de 1 cm. Todavia, é conveniente adoptar um equilíbrio adequado entre o requisito de menor altura possível na centrifugação e a facilidade de manipulação pelo experimentador na separação das fases após a centrifugação.

▼B

5. Além disso, na definição das condições experimentais para a separação de fases solo/solução é conveniente ter em conta a possível existência de uma «pseudofase» coloidal. As partículas coloidais, de diâmetro inferior a 0,2 μm, podem apresentar um impacto considerável no mecanismo de adsorção de uma substância numa suspensão de solo. Sempre que se executa uma centrifugação do modo descrito *supra,* os colóides permanecem na fase aquosa, sendo objecto de análise juntamente com esta última. Perdem-se, pois, as informações referentes ao seu impacto.

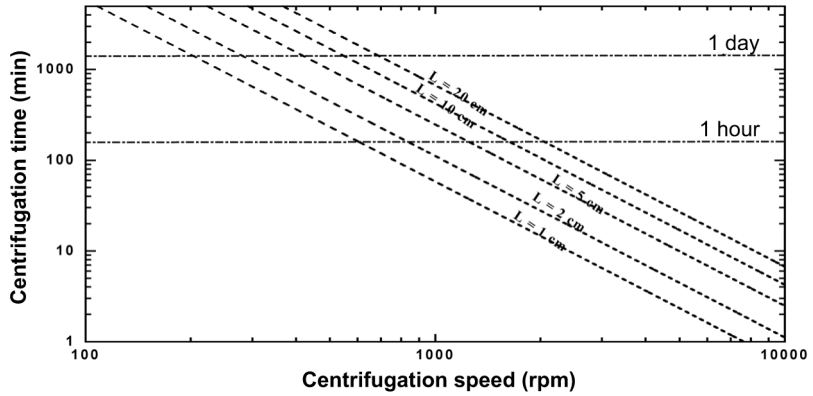
   Caso o laboratório possua condições para efectuar ultracentrifugação ou ultrafiltração, a adsorção/dessorção de uma substância no solo pode ser estudada de modo mais aprofundado, permitindo obter informações sobre a adsorção da substância nos colóides. Neste caso, deve efectuar-se uma ultracentrifugação a 60 000 rpm/minuto ou uma ultrafiltração com um filtro de 100 000 Daltons de porosidade, de modo a separar as três fases (solo, colóides, solução). O protocolo de ensaio deve também ser alterado de modo a assegurar a determinação da substância em estudo nas três fases.

Fig. 1a.



Variação do tempo de centrifugação (t) em função da velocidade de centrifugação (rpm), para solos de diversas densidades (ρ_s). R_t = 10 cm, R_b -R_t = 10 cm, $\eta = 8{,}95 \times 10^{-3}$g $s^{-1}cm^{-1}$ e ρ_{aq} = 1,0 g.cm^{-3} a 25 °C.

Fig. lb.



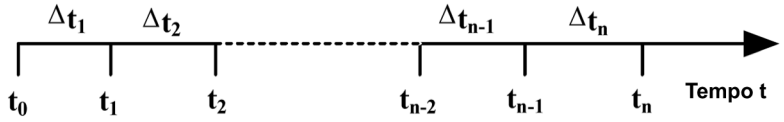
Variação do tempo de centrifugação (t) em função da velocidade de centrifugação (rpm) para diversas alturas da mistura nos tubos de ensaio (R|,-R,) - L; R_t = 10 cm, $\eta = 8{,}95 \times 10^{-3}$g $s^{-1}cm^{-1}$, ρ_{aq} = 1,0 g.cm^{-3} a 25 °C e ρ_s = 2,0 g cm^{-3}.

▼B

Apêndice 5

CÁLCULO DA ADSORÇÃO A (%) E DA DESSORÇÃO D (%)

O esquema cronológico do ensaio é o seguinte:



Em todos os cálculos, presume-se que a substância de ensaio é estável e não exibe uma adsorção significativa nas paredes do recipiente.

ADSORÇÃO A (A %)

a) *Método paralelo*

Para cada tubo de ensaio (i), a percentagem de adsorção em cada instante (t_j) é calculada de acordo com a equação:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{ads}(t_i) \cdot 100}{m_0} \ (\%) \qquad (1)$$

Os termos da equação podem ser calculados do seguinte modo:

$$m_0 = C_0 \cdot V_0 \ (\mu g) \qquad (2)$$

$$m_s^{ads}(t_i) = m_0 - C_{aq}^{ads}(t_i) \cdot V_0 \ (\mu g) \qquad (3)$$

em que:

A_{ti} = percentagem de adsorção (%) no instante t_j;

$m_s^{ads}(t_i)$ = massa da substância em estudo presente no solo no instante t_j em que a análise é efectuada (μg)

m_0 = massa da substância em estudo presente no tubo de ensaio no início do mesmo (μg)

C_0 = concentração ponderal inicial da solução em contacto com o solo (μg cm^{-3})

▼B

$C_{aq}^{ads}(t_i)$ = concentração ponderal da substância na fase aquosa no instante t_i em que a análise é efectuada (μg cm^{-3}): a determinação analítica desta concentração tem em conta os valores obtidos nos ensaios em branco.

V_0 = volume inicial de solução em contacto com o solo (cm^3).

Os valores relativos à percentagem de adsorçãoA_{t_j} ou$C_{aq}^{ads}(t_j)$ são representados graficamente em função do tempo, determinando-se o tempo necessário para atingir o estado de equilíbrio. As figuras 1 e 2, respectivamente, fornecem exemplos das representações em causa.

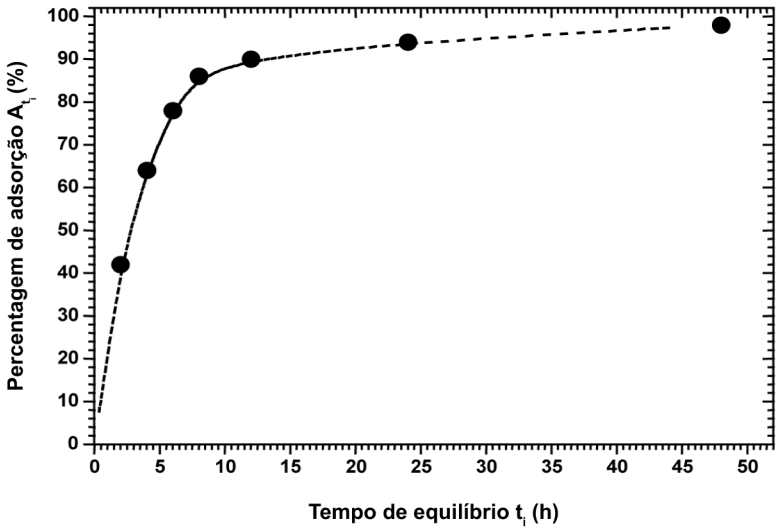


Figura 1.

Representação gráfica do equilíbrio de adsorção

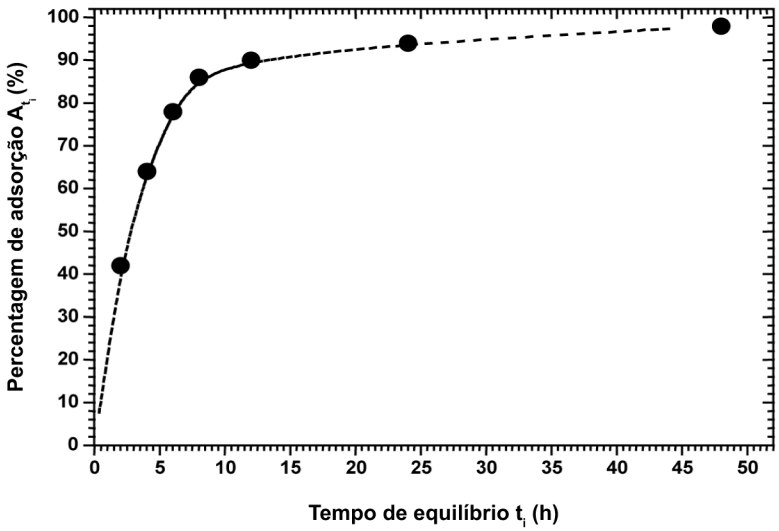


Fig. 2.

Concentraçào mássica da substância em estudo na fase aquosa (C_{aq}) em funçào do tempo

▼B

b) *Método sequencial*

As equaçóes que se seguem tém em consideraçào o facto de o ensaio de adsorçào se basear em determinaçóes da substância em estudo em pequenas alíquotas da fase aquosa, a intervalos específicos.

— A quantidades de substância adsorvida no solo em cada intervalo é calculada do seguinte modo:

— princiro intervalo $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_s^{ads}(\Delta t_1) = m_0 - m_m^{ads}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A}\right) \quad (4)$$

— segundo intervalo $\Delta t2 = t_2 - t_1$

$$m_s^{ads}(\Delta t_2) = m_m^{ads}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A}\right) - m_m^{ads}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A}\right) \quad (5)$$

— terceiro intervalo $\Delta t3 = t_3 - t_2$

$$m_s^{ads}(\Delta t_3) = m_m^{ads}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A}\right) - m_m^{ads}(t_3) \cdot \left(\frac{V_0 - 2 \cdot v_a^A}{v_a^A}\right) \quad (6)$$

— enésimo intervalo $\Delta tn = t_n - t_{n-1}$

$$m_s^{ads}(\Delta t_n) = m_m^{ads}(t_{n-1}) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-2) \cdot v_a^A}{v_a^A}\right) - m_m^{ads}(t_n) \cdot \left(\frac{(V_0 - (n-1) \cdot v_a^A)}{v_a^A}\right) \quad (7)$$

— A percentagem de adsorção em cada intervalo,$A_{\Delta t_i}$, é calculada por recurso à seguinte equação:

$$A_{\Delta t_i} = \frac{m_s^{ads}(\Delta t_i)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (8)$$

enquanto que a percentagem de adsorçãoA_{t_i} no instante t_i é dada por:

$$A_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t^i} m_s^{ads}(j)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (9)$$

Os valores correspondentes à adsorção,A_{t_i} ou$A_{\Delta t_i}$ (de acordo com o objectivo do estudo) são representados graficamente em função do tempo, determinando-se o tempo necessário para atingir o estado de equilíbrio.

— No instante de equilíbrio t_{eq}:

— a massa de substância em estudo adsorvida no solo é dada por:

$$m_s^{ads}(eq) = \sum_{\Delta t_i=1}^{n} m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (10)$$

▼B

— a massa de substância em estudo na solução é dada por:

$$m_{aq}^{ads}(eq) = m_0 - \sum_{\Delta t_i=1}^{n} m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (11)$$

— a percentagem de adsorção no estado de equilíbrio é calculada com base na equação:

$$A_{eq} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (12)$$

Os parâmetros utilizados são definidos do seguinte modo:

$m_s^{ads}(\Delta t_1)$, $m_s^{ads}(\Delta t_2)$, ..., $m_s^{ads}(\Delta t_n)$ = massa de substância adsorvida no solo nos intervalos Δ_{t1}, Δ_{t2},..., Δ_{tn} respectivamente (μg);

$m_m^{ads}(t_1)$, $m_m^{ads}(t_2)$, ..., $m_n^{ads}(t_n)$ = massa de substância em estudo determinada numa alíquota $v_a{}^A$ nos intervalos t_1, t_2,t_n respectivamente (μg);

$m_s^{ads}(eq)$ = massa de substância adsorvida no solo no estado de equilíbrio de adsorção (μg);

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = massa de substância presente na solução no estado de equilíbrio de adsorção (μg);

$v_a{}^A$ = volume da alíquota em que se determina a substância em estudo (cm^3);

$A_{\Delta ti}$ = percentagem de adsorção correspondente ao intervalo Δt_i (%);

A_{eq} = percentagem de adsorção no estado de equilíbrio de adsorção (%).

DESSORÇÃO D (%)

Considera-se que o ensaio de cinética de dessorção tem início no instante t_0 em que o volume máximo recuperado da solução da substância em estudo (após atingir o equilíbrio de adsorção) é substituído pelo mesmo volume de solução de $CaCl_2$, 0,01 M.

a) *Método paralelo*

Num determinado instante t_i, determina-se a massa da substância em estudo presente na fase aquosa recolhida do tubo i (V_r^i), calculando-se a massa dessorvida de acordo com a equação:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_0}{V_r^i}\right) - m_{aq}^{A} \quad (13)$$

No estado de equilíbrio de dessorção, $t_i = t_{eq}$ e, portanto,$m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$

A massa de substância em estudo dessorvida no intervalo At_i é dada pela equação:

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_i) = m_{aq}^{des}(t_i) - \sum_{j=1}^{i=1} m_{aq}^{des}(j) \quad (14)$$

A percentagem de dessorção é calculada do seguinte modo:

num instante t_i, com base na equação:

▼B

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \tag{15}$$

num intervalo At_i, com base na equação:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \tag{16}$$

em que:

D_{ti} = percentagem de dessorção no instante t_i (%);

$D_{\Delta ti}$ = percentagem de dessorção correspondente ao intervalo Δt_i (%);

$m_{aq}^{des}(t_1)$ = massa de substância em estudo dessorvida no instante t_i, (μg);

$m_{aq}^{des}(\Delta t_1)$ = massa de substância em estudo dessorvida no intervalo Δt_i (μg);

$m_m^{des}(t_i)$ = massa de substância em estudo determinada analiticamente no instante t_i num volume V_r^i,de solução recolhida para análise (μg);

$m_{aq}{}^{A}$ = massa de substância em estudo excluída do equilíbrio de adsorção devido a substituição incompleta de volumes (μg).

$$m_{aq}^{A} = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0}\right) \tag{17}$$

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = massa de substância em estudo presente na soluçào no estado equilíbrio de adsorçào (μg).

V_R = volume de sobrenadante removido do tubo depois de atingido o estado de equilíbrio de adsorçào e substituído pelo mesmo de soluçào de $CaCl_2$ 0,01 M (cm^3):

$V_r^{\ i}$ = volume de soluçào recolhido do tubo (i) para a determinaçào da substância em estudo, no ensaio de cinética de dessorçào (cm^3)

Os valores correspondentes à dessorção $D_t^{\ i}$ or$D_{\Delta t^i}$ (de acordo com o objectivo do estudo) são representados graficamente em função do tempo, determinando-se o tempo necessário para atingir o estado de equilíbrio.

b) *Método sequencial*

As equações que se seguem têm em consideração o facto de o ensaio de adsorção precedente se basear em determinações da substância em estudo em pequenas alíquotas ((v_a^A)) da fase aquosa (método sequencial descrito na secção 1.9. «Realização do ensaio»). Presume-se que: a) o volume de sobrenadante removido do tubo na sequência do ensaio de cinética de adsorção foi substituído pelo mesmo volume de solução de $CaCl_2$ 0,01 M (V_R); e b) o volume total da fase aquosa em contacto com o solo (V_T) durante o ensaio de cinética de dessorção permanece constante, sendo dado pela equação:

$$V_T = V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \tag{18}$$

▼B

Num determinado instante t_i:

— Determina-se a massa da substância em estudo presente numa pequena alíquota ((v_a^D)), calculando-se a massa dessorvida de acordo com a equação:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{\left(V_T - (i-1) \cdot v_a^D\right)}{V_T}\right) \quad (19)$$

— No estado de equilíbrio de dessorção $t_i = t_{eq}$ e, portanto, $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$.

— A percentagem de dessorção D_{t_i} é calculada por recurso à equação:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (20)$$

Num intervalo (Δt_i):

A quantidade de substância dessorvida em cada intervalo é calculada do seguinte modo:

— primeiro intervalo $\Delta t_i = t_1 - t_0$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_1) = m_m^{des}(t_1) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \text{ and} m_s^{des}(t_1) = m_s^{aq}(eq) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \quad (21)$$

— segundo intervalo $\Delta t_i = t_2 - t_1$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_2) = m_m^{des}(t_2) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \cdot \left(\frac{(V_T - v_a^D)}{V_T}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{(V_T - v_a^D)}{V_T}\right) \text{ and} \quad (22)$$

$$m_s^{des}(t_2) = m_s^{ads}(eq) - \left[m_{aq}^{des}(\Delta t_1) + m_{aq}^{des}(\Delta t_2)\right]$$

— enésimo intervalo $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_n) = \left[m_m^{des}(t_n) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{\left(V_T - (n-1) \cdot v_a^D\right)}{V_T}\right) - \sum_{i=1, n\neq 1}^{n-1} \left(\frac{(V_T - (n-i) \cdot v_a^D)}{V_T} \cdot m_{aq}^{des}(\Delta t_i)\right)\right] \quad (23)$$

and

$$m_s^{des}(t_n) = m_s^{ads}(eq) - \sum_{i=1, n\neq 1}^{n} m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$$

Por fim, a percentagem de dessorção em cada intervalo, $D_{\Delta t_i}$, é calculada por recurso à seguinte equação:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (24)$$

enquanto que a percentagem de dessorção D_{t_i} no instante t_i é dada por:

$$D_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_i}^{\Delta t_i} m_{aq}^{des}(j)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100(\%) \quad (25)$$

▼B

os parâmetros supra são definidos do seguinte modo:

$m_s^{des}(\Delta t_1)$, $m_s^{des}(\Delta t_2)$,... , $m_s^{des}(\Delta t_n)$ = massa de substância que permanece adsorvida no solo nos intervalos Δt_1, Δt_2,..., Δt_n respectivamente (μg);

$m_{aq}^{des}(\Delta t_1)$, $m_{aq}^{des}(\Delta t_2)$,... , $m_{aq}^{des}(\Delta t_n)$ = massa de substância em estudo dessorvida nos intervalos Δt_1, Δt_2,..., Δt_n respectivamente (μg);

$m_m^{des}(t_1)$, $m_m^{des}(t_2)$,... , $m_m^{des}(t_n)$ = massa de substância determinada numa alíquota(v_a^D) nos instantes t_1,t_2,..., t_n, respectivamente (μg);

V_T = volume total da fase aquosa em contacto com o solo durante o ensaio de cinética de dessorção efectuado pelo método sequencial (cm^3);

m_{aq}^A = massa de substância em estudo excluído do equilíbrio de adsorção devido a substituição incompleta de volumes (μg)

$$m_{aq}^A = \left(\frac{\left(V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \right) - V_R}{V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i)} \right) \cdot m_{aq}^{ads}(eq) \quad (26)$$

V_R = volume de sobrenadante removido do tubo após atingir o estado de equilíbrio de adsorção e substituído pelo mesmo volume de solução de $CaCl_2$0,01 M (cm^3)

v_a^D = volume da alíquota recolhida do tubo para fins analíticos (i), durante o ensaio de cinética de dessorção efectuado pelo método sequencial (cm^3);

$$v_a^D \leq 0{,}02 \cdot V_T \quad (27)$$

▼B

Apêndice 6

ADSORÇÃO-DESSORÇÃO EM SOLOS: FICHA DE APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

Substância ensaiada:

Solo ensaiado:

Massa seca do solo (105°C, 12 h): .....%

Temperatura: °C

Adequabilidade do método analítico

Massa da amostra de solo	g	
Massa seca de solo	g	
Volume de solução de $CaCl_2$	cm^3	
Concentração nominal final da solução	$\mu g\ cm^{-3}$	
Concentração analítica final da solução	$\mu g\ cm^{-3}$	

Princípio do método analítico utilizado:

Calibração do método analítico:

Substância ensaiada:

Solo ensaiado:

Massa seca do solo (105 °C, 12 h): ..... %

Temperatura: ..... °C

Metodologia analítica adoptada: Método indirecto ☐ Método paralelo ☐ Método sequencial ☐ Método directo ☐

Ensaio de adsorção: amostras

	Símbolo	Unidades	Tempo necessário para atingir o equilíbrio		Tempo necessário para atingir o equilíbrio		Tempo necessário para atingir o equilíbrio		Tempo necessário para atingir o equilíbrio	
Tubo n.º										
Solo: massa determinada	—	g								
Solo: massa seca	m_{solo}	g								
Volume calculado de humidade no solo	V_{ws}	cm^3								
Volume de solução de $CaCl_2$ 0,01 M necessário para equilibrar o solo		cm^3								
Volume de solução-mãe		cm^3								
Volume total da fase aquosa em contacto com o solo	v_0	cm^3								
Concentração inicial da solução de ensaio	c_0	$\mu g\ cm^3$								
Massa de substância em estudo no início do ensaio	m_0	µg								

▼B

	Símbolo	Unidades	Tempo necessário para atingir o equilíbrio		Tempo necessário para atingir o equilíbrio		Tempo necessário para atingir o equilíbrio		Tempo necessário para atingir o equilíbrio	
Após agitação e centrifugação										
MÉTODO INDIRECTO										
Método paralelo										
Concentração da substância em estudo na fase aquosa, incluindo d correcção decorrente do ensaio em branco	$C_{aq}^{ads}(t_i)$	µg cm^{-3}								
Método sequencial										
Massa de substância em estudo determinada na alíquota V^{A}_{a}	$m_m^{ads}(t_i)$	µg								
MÉTODO DIRECTO										
Massa da substância em estudo adsorvida no solo	$m_s^{ads}(t_i)$	µg								
Cálculo da adsorção										
Adsorção	A_{t_i}	%								
	$A_{\Delta t_i}$	%								
Método										
Coeficiente de adsorção	K_d	cm^3 g^{-1}								
Método										
Coeficiente de adsorção	K_{oc}	cm^3 g^{-1}								
Método										

Substância ensaiada:

Solo ensaiado:

Massa seca de solo (105°C, 1 2 h): ..... %

Temperatura: ..... °C

Adsorção: ensaios em branco e de controlo

	Símbolo	Unidades	Branco		Branco		Controlo	
Tubo n.°								
Massa da amostra de solo		g					0	0
Teor de humidade calculado no solo		cm^3					—	—
Volume de solução de $CaCl_2$ 0,01 M adicionado		cm^3						
Volume de solução-mãe da substância em estudo adicionado		cm^3	0	0				
Volume total da fase aquosa (calculado)		cm^3					—	—

▼B

	Símbolo	Unidades	Branco		Branco		Controlo	
Concentração inicial da substância em estudo na fase aquosa		µg cm^{-3}						
Após agitação e centrifugação								
Concentração da fase aquosa		µg cm^{-3}						

Nota: Aditar colunas suplementares, se necessário.

Substância ensaiada:

Solo ensaiado:

Massa seca do solo (105°C, 1 2 h): %

Temperatura: °C

Balanço de massas

	Símbolo	Unidades				
Tubo n.°						
Massa da amostra de solo	—	g				
Massa seca de solo	m_{solo}	g				
Volume de água calculado no solo	V_{WS}	ml				
Volume de solução de $CaCl_2$ 0,01 M necessário para equilibrar o solo		ml				
Volume de solução-mãe		cm^3				
Volume total de fase aquosa em contacto com o solo	v_0	cm^3				
Concentração inicial da solução de ensaio	C_0	µg cm^{-3}				
Tempo necessário para atingir o equilíbrio	—	h				
Após agitação e centrifugação						
Concentração da substância em estudo na fase aquosa no estado de equilíbrio de adsorção, incluindo a correcção decorrente do ensaio em branco	$C_{aq}^{ads}(eq)$	µg cm^3				
Tempo necessário para atingir o equilíbrio	t_{eq}	h				
Primeira diluição com solvente						
Volume de fase aquosa removido	V_{rec}	cm^3				
Volume de solvente adicionado	ΔV	cm^3				
Primeira extracção com solvente						
Intensidade do sinal do detector (solvente)	s_{EI}	var.				
Concentração da substância em estudo no solvente	C_{EI}	µg cm^{-3}				

▼B

	Símbolo	Unidades				
Massa de substância extraída do solo e das paredes do recipiente	m_{E1}	µg				
Segunda diluição com solvente com solvente						
Volume de solvente removido	ΔV_s	cm^3				
Volume de solvente adicionado	$\Delta V'$	cm^3				
Segunda extracção com solvente						
intensidade do sinal do detector (solvente)	S_{E2}	var.				
Concentração da substância em estudo no solvente	C_{E2}	µg cm^{-3}				
Massa de substância extraída do solo e das paredes do recipiente	m_{E2}	µg				
Massa total de substância em estudo extraída nas duas etapas	m_E	µg				
Balanço de massas	MB	%				

Substância ensaiada:

Solo ensaiado:

Massa seca de solo (105°C, 12 h): ..... %

Temperatura: ..... °C

Isotérmicas de adsorção

	Símbolo	Unidades								
Tubo n.º										
Massa da amostra de solo	—	g								
Massa seca de solo	E	g								
Volume de água calculado no solo	V_{ws}	cm^3								
Volume de solução de $CaCl_2$ 0,01 M necessário para equilibrar o solo		cm^3								
Volume de solução-mãe adicionado		cm^3								
Volume total de fase aquosa em contacto com o solo (calculado)	v_0	cm^3								
Concentração da solução	C_0	µg cm^3								
Tempo necessário para atingir o equilíbrio	—	h								

▼B

	Símbolo	Unidades								
Após agitação e centrifugação										
Concentração da substância na fase aquosa, incluindo a correcção decorrente do ensaio em branco	$C_{aq}^{ads}(eq)$	µg cm^{-3}								
Temperatura		°C								
Massa adsorvida por unidade de solo	$C_{s}^{ads}(eq)$	µg g^{-1}								

Análise por regressão linear:

valor de KK_F^{ads}:

valor de l/n:

coeficiente de regressão r^2:

Substância ensaiada:

Solo ensaiado:

Massa seca do solo (105°C, 1 2 h): ..... %

Temperatura: ..... °C

Metodologia analítica adoptada: Método indirecto ☐ Método paralelo ☐ Método sequencial ☐

Ensaio de dessorção

		Símbolo	Unidades	Intervalo	Intervalo	Intervalo	Intervalo
Número do tubo no ensaio de adsorção							
Massa de substância adsorvida no solo no estado de equilíbrio de adsorção		$m_s^{ads}(eq)$	µg				
Volume de fase aquosa removido e substituído por solução de $CaCl_2$ 0,01 M		V_R	cm^3				
Volume total de fase aquosa em contacto com o solo	PM	V_0	cm^3				
	SM	V_T	cm^3				
Massa de substância em estudo excluída do equilíbrio de adsorção devido a substituição incompleta de volumes		m_{aq}^A	µg				
Cinética de dessorção							
Massa determinada de substância dessorvida do solo no instante t_i		$m_m^{des}(t_i)$	µg				
Volume de solução recolhida do tubo (i) para determinação da substância em estudo	PM	V_f^i	cm^3				
	SM	v_a^A	cm^3				
Massa de substância dessorvida do solo no instante t_i (calculada)		$m_{aq}^{des}(t_i)$	µg				
Massa de substância dessorvida do solo no intervalo Δt_i (calculada)		$m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$	µg				

▼B

	Símbolo	Unidades	Intervalo	Intervalo	Intervalo	Intervalo
Percentagem de dessorção						
Dessorção no instante t_i	D_{t_i}	%				
Dessorção no intervalo Δt_i	$D_{\Delta t_i}$	%				
Coeficiente de dessorção aparente	K_{des}					

PM: Método paralelo

SM: Método sequencial

▼B

C.19. ESTIMATIVA DO VALOR DO COEFICIENTE DE ADSORÇÃO (K_{OC}) EM SOLOS E EM LAMAS DE DEPURAÇÃO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)

1. MÉTODO

O presente método baseia-se na publicação OECD TG 121 (2000) (normas de ensaio da OCDE).

1.1. INTRODUÇÃO

O comportamento absortivo e/ou adsortivo das substâncias presentes em solos ou lamas de depuração pode ser descrito por meio de parâmetros determinados experimentalmente, através do método de ensaio C 18. O coeficiente de adsorção é um parâmetro importante, definido como a razão entre a concentração da substância no solo/ /lamas e a concentração da substância na fase aquosa, em condições de equilíbrio de adsorção. O coeficiente de adsorção normalizado para o teor de carbono orgânico no solo (K_{oc}), é um indicador útil da capacidade de ligação de um composto químico à matéria orgânica presente no solo e nas lamas de depuração, permitindo que se estabeleçam comparações entre os diferentes compostos químicos. Este parâmetro pode ser estimado através de correlações com a solubilidade em água e com o coeficiente de partição n-octanol/água (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7).

O método experimental descrito no presente ensaio utiliza a técnica HPLC para estimar o coeficiente de adsorção K_{oc} em solos e em lamas de depuração (8). Os valores estimados são mais fiáveis que os obtidos através do método de cálculos QSAR («quantitative structure-activity relationships», relações quantitativas estrutura/actividade) (9). Por se tratar de um método estimativo, o presente método experimental não pode substituir completamente as experiências em reactor descontínuo que são utilizadas no método de ensaios C l8. No entanto, o valor estimado para K_{oc} pode ser útil na escolha dos parâmetros de ensaio adequados para estudos de adsorção/dessorção de acordo com o método de ensaios C l8, através do cálculo de K_d (coeficiente de distribuição) ou de K_l (coeficiente de adsorção de Freundlich), segundo a equação 3 (ver ponto 1.2).

1.2. DEFINIÇÕES

K_d: coeficiente de distribuição. Este coeficiente é definido como a razão entre as concentrações de equilíbrio (C), de uma substância de ensaio dissolvida num sistema bifásico constituído por um componente com comportamento absortivo e/ou adsortivo (solo ou lamas de depuração) e uma fase aquosa. Esta grandeza é adimensional quando as concentrações em ambas as fases são expressas em peso/peso. No caso da concentração da fase aquosa ser expressa em peso/volume, as unidades utilizadas são $ml.g^{-1}$. O valor de K_d pode variar com as propriedades do componente com comportamento absortivo e/ou adsortivo, assim como depender da sua concentração.

$$K_d = \frac{C_{soil}}{C_{aq}} \; or \; \frac{C_{sludge}}{C_{aq}} \qquad (1)$$

em que:

C_{solo} = concentração da substância de ensaio no solo, no equilíbrio ($\mu g \cdot g^{-1}$)

C_{lamas} = concentração da substância de ensaio nas lamas, no equilíbrio, ($\mu g \cdot g^{-1}$)

C_{aq} = concentração da substância de ensaio na fase aquosa, no equilíbrio ($\mu g \cdot g^{-1}$, $\mu g \cdot ml^{-1}$).

▼B

K_f: coeficiente de adsorção de Freundlich. Este coeficiente é definido como a concentração da substância de ensaio no solo ou nas lamas de depuração (x/m) quando a concentração de equilíbrio na fase aquosa (C_{aq}) é igual a um. Esta grandeza é expressa em μg • g^{-1} de componente com comportamento absortivo e/ou adsortivo. O valor de K_f pode ser afectado pelas propriedades desse componente.

$$\log \frac{x}{m} = \log K_f + \frac{1}{n} \cdot \log C_{aq} \quad (2)$$

em que:

x/m = quantidade da substância de ensaio x (μg) adsorvida numa quantidade m (g) de componente com comportamento absortivo e/ou adsortivo, no equilíbrio

l/n = declive da isotérmica de adsorção de Freundlich

C_{aq} = concentração da substância de ensaio na fase aquosa, no equilíbrio (μg • ml^{-1})

$$AtC_{aq} = 1;\ \log K_f = \log \frac{x}{m}$$

K_{oc}: coeficiente de distribuição (K_d) ou coeficiente de adsorção de Freundlich (K_f) normalizados para o teor de carbono orgânico (f_{oc}), de um componente com comportamento absortivo e/ou adsortivo. Esta grandeza é um indicador adequado do grau de adsorção entre a substância e o componente com comportamento absortivo e/ou adsortivo, principalmente no caso de compostos químicos não ionizados, permitindo que sejam feitas comparações entre diferentes compostos químicos. Dependendo das unidades de K_d ou de K_f, o K_{oc} pode ser adimensional ou expresso em ml • g^{-1} or μg • g^{-1} de matéria orgânica:

$$Koc = \frac{Kd}{foc}\left(\text{adimensional ou ml} \cdot g^{-1}\right) \text{or} \frac{Kf}{foc}\left(\mu g \cdot g^{-1}\right) \quad (3)$$

Embora a relação entre K_{oc} e K_d não seja sempre linear, pelo que os valores de K_{oc} podem variar de solo para solo, esta variabilidade é significativamente reduzida comparativamente à registada para os valores de K_d ou K_f,

O coeficiente de adsorção (K_{oc}) é deduzido a partir do factor de capacidade (k^1), utilizando uma curva de calibração de log k^1 em função de log K_{oc} dos compostos de referência seleccionados.

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (4)$$

em que:

t_R = tempo de retenção em HPLC da substância de ensaio e da substância de referência (em minutos)

t_0 = tempo-limite em HPLC (minutos) (ver ponto 1.8.2).

P_{OW}: coeficiente de partição octanol-água. Este coeficiente define-se como a razão entre as concentrações da substância dissolvida em n-octanol e em água. Trata-se de uma grandeza adimensional

$$Pow = \frac{Coctanol}{Caq} (= Kow) \quad (5)$$

1.3. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

Antes da utilização do método, é necessário conhecer a fórmula estrutural, o grau de pureza e a constante de dissociação (caso seja adequado). Será útil dispor de informações relativas à solubilidade em água e em solventes orgânicos, ao coeficiente de partição octanol-água e às características de hidrólise.

▼B

De forma a correlacionar os valores de retenção, medidos em HPLC, de uma substância de ensaio com o seu coeficiente de adsorção, K_{oc}, deverá ser traçada uma curva de calibração de log K_{oc} em função de log k^1. Deverão ser utilizados, no mínimo, seis valores de referência, dos quais pelo menos um deverá estar acima e outro abaixo do valor esperado para a substância de ensaio. O grau de exactidão do método será melhorado significativamente se forem utilizadas substâncias de referência estruturalmente relacionadas com a substância de ensaio. Caso estes dados não estejam disponíveis, cabe ao analista seleccionar as substâncias de calibração adequadas. Nesse caso, deverá ser escolhido um conjunto mais abrangente de substâncias, estruturalmente heterogéneas. Nas tabelas 1 e 3 do apêndice apresentam-se listas das substâncias e valores de K_{oc} que podem ser utilizados para as lamas de depuração e para os solos, respectivamente. A selecção de outras substâncias de calibração deverá ser devidamente justificada.

1.4. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

O HPLC é realizado em colunas analíticas com enchimento de cianopropilo comercial em fase sólida contendo grupos lipofílicos e grupos polares. E utilizada uma fase estacionária com polaridade moderada baseada numa matriz de sílica.

– O – Sí	$–CH_2 –CH_2 –CH_2$	–CN
sílica	espaçador apolar	grupo polar

O princípio do método de ensaio é semelhante ao utilizado no método de ensaio A.8 (coeficiente de partição, método de HPLC). A substância de ensaio interage com a fase estacionária ao passar pela coluna juntamente com a fase móvel, sendo retardada em resultado da partição entre as fases móvel e estacionária. A composição mista da fase estacionária, que contém grupos polares e grupos apoiares, permite que a interacção dos grupos polares e apoiares de determinada molécula ocorra de forma semelhante à que se verifica com a matéria orgânica em matrizes de solo ou de lamas de depuração, possibilitando o estabelecimento de uma relação entre o tempo de retenção na coluna e o coeficiente de adsorção à matéria orgânica.

O pH tem uma influência significativa no comportamento absortivo e/ou adsortivo, sobretudo no caso de substâncias polares. Em solos agrícolas ou em tanques de estações de tratamento de águas residuais, o pH varia normalmente entre 5,5 e 7,5. Relativamente a substâncias ionizáveis, deverão ser efectuados dois ensaios, um com a forma ionizada e outro com a forma não ionizada em soluções tampão adequadas, apenas nos casos em que pelo menos 10 % do composto de ensaio se encontre dissociado a pH entre 5,5 e 7,5.

Uma vez que, para avaliar os resultados, utiliza-se apenas a relação entre a retenção na coluna de HPLC e o coeficiente de adsorção, não é necessário utilizar qualquer método quantitativo, determinar o tempo de retenção. Caso se disponha de um conjunto adequado de substâncias de referência e estejam estabelecidas condições experimentais-padrão, o presente método constitui um modo rápido e eficaz para estimar o valor do coeficiente de adsorção K_{oc}.

1.5. APLICABILIDADE DO ENSAIO

O método de HPLC é aplicável a substâncias químicas (marcadas ou não) para as quais exista um sistema de detecção adequado (por exemplo, espectrofotómetro, detector de radioactividade) e que sejam suficientemente estáveis durante o período de ensaio. O método pode ser particularmente útil no caso de produtos químicos que sejam difíceis de estudar com outros sistemas experimentais (ou seja, substâncias voláteis, substâncias que não são solúveis em água em concentrações que possam ser determinadas analiticamente, substâncias que apresentem uma elevada afinidade para a superfície dos sistemas de incubação). O método pode ser utilizado para misturas que apresentam bandas de eluição não resolvidas. Nesse caso, devem ser referidos os limites superior e inferior dos valores de log K_{oc} dos compostos presentes na mistura de ensaio.

▼B

As impurezas podem por vezes representar um problema para a interpretação dos resultados de HPLC. No entanto, a sua influência pode ser minimizada se a substância de ensaio puder ser inequivocamente identificada pelo método analítico e separada das impurezas.

O presente método encontra-se validado para as substâncias descritas na tabela 1 do apêndice, tendo sido igualmente aplicado a uma série de outros compostos químicos pertencentes às seguintes famílias de compostos:

— aminas aromáticas (por exemplo, trifluralina, 4-cloroanilina, 3,5--dinitroanilina, 4-metilanilina, N-metilanilina, l-naftilamina),

— ésteres de ácidos carboxílicos aromáticos (por exemplo, éster metílico do ácido benzóico, éster etílico do ácido 3,5-dinitrobenzóico),

— hidrocarbonetos aromáticos (por exemplo, tolueno, xileno, etilbenzeno, nitrobenzeno),

— ésteres do ácido ariloxifenoxipropiónico (por exemplo, diclofop-metilo, fenoxaprop-etilo, fenoxaprop-P-etilo),

— fungicidas benzimidazólicos e imidazólicos (por exemplo, carbendazim, fuberidazol, triazóxido),

— amidas de ácidos carboxílicos (por exemplo, 2-clorobenzamida, N,N-dimetilbenzamida, 3,5-dinitrobenzamida, N-metilbenzamida, 2-nitrobenzamida, 3-nitrobenzamida),

— hidrocarbonetos clorados (por exemplo, endosulfan, DDT, hexaclorobenzeno, quintozeno, 1.2.3-triclorobenzeno),

— insecticidas organo-fosforados (por exemplo, azinfos-metilo, dissulfotão, fenamifos, isofenfos, pirazofos, sulprofos, triazofos),

— fenóis (por exemplo, fenol, 2-nitrofenol, 4-nitrofenol, pentaclorofenol, 2,4,6-triclorofenol, 1-naftol),

— derivados da fenilureia (por exemplo, isoproturão, monolinurão, pencicurão),

— corantes (por exemplo, Amarelo Acido 219, Azul Básico 41, Vermelho Directo 81),

— hidrocarbonetos poliaromáticos (por exemplo, acenafteno, naftaleno),

— herbicidas do tipo 1,3,5-triazina (por exemplo, prometrino, propazina, simazina, terbutrina),

— derivados de triazole (por exemplo, tebuconazole, triadimefona, tradimenol, triapentenol).

O presente método não é aplicável a substâncias que reajam com o eluente ou com a fase estacionária nem a substâncias que interajam de forma específica com componentes inorgânicos (por exemplo, formação de agregados de complexos com minerais argilosos). O presente método pode não ser adequado para a análise de surfactantes, compostos inorgânicos ou ácidos e bases moderadamente fortes ou fortes. O presente método permite determinar valores de log K_{oc} entre 1,5 e 5,0. Na medição de substâncias ionizáveis deve utilizar-se uma fase móvel tamponada, sendo necessário tomar precauções de modo a evitar a precipitação dos componentes do tampão ou da substância de ensaio.

▼B

1.6. CRITÉRIOS DE QUALIDADE

1.6.1. **Exactidão**

De um modo geral, o coeficiente de adsorção de uma substância de ensaio pode ser estimado com uma margem de erro de ± 0,5 unidades de logaritmo, relativamente ao valor determinado em reactor descontínuo (ver tabela 1 do apêndice). Poderá obter-se um grau de exactidão superior se se utilizarem substâncias de referência estruturalmente relacionadas com a substância de ensaio.

1.6.2. **Repetitividade**

Cada determinação deve ser feita pelo menos em duplicado. Os valores de log K_{oc} obtidos em cada medição devem encontrar-se numa gama de 0,25 unidades de logaritmo.

1.6.3. **Reprodutibilidade**

A experiência obtida até ao momento com a aplicação do presente método suporta a sua validade. Numa análise do método de HPLC, realizada com 48 substâncias (pesticidas, na sua maior parte) relativamente às quais existiam valores fiáveis de K_{oc} em solos, o coeficiente de correlação obtido foi de R = 0,95 (10) (11).

De modo a melhorar e validar o presente método, foi efectuado um ensaio comparativo interlaboratorial no qual participaram 11 laboratórios (12). Os resultados desse ensaio são apresentados na tabela 2 do apêndice.

1.7. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.7.1. **Estimativa preliminar do coeficiente de adsorção**

O coeficiente de partição octanol-água P_{ow} (= K_{ow}), assim como, em certa medida, a solubilidade em água, podem ser utilizados como indicadores da extensão da adsorção, em particular para substâncias não ionizáveis, podendo assim ser utilizados numa primeira aproximação com vista a determinar a gama de variação do valor do coeficiente de adsorção. Relativamente a vários grupos de compostos químicos. Têm sido publicadas uma série de correlações úteis relativamente a vários grupos de compostos químicos (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7).

1.7.2. **Equipamento**

É necessário um cromatógrafo de fase líquida equipado com uma bomba de pulsação livre e um equipamento de detecção adequado. Recomenda-se a utilização de uma válvula de injecção com ciclos de injecção. Deverão ser utilizadas resinas comerciais de cianopropilo quimicamente ligado a uma base de sílica (por exemplo, Hypersil e Zorbax CN). Poderá interpor-se uma coluna de protecção do mesmo material entre o sistema de injecção e a coluna analítica. A eficiência de separação das colunas poderá variar substancialmente em função do fabricante. Como referência, relativamente aos factores de capacidade k' deverão ser atingidas os seguintes valores: log k' > 0,0 para log K_{oc} = 3,0 e log k' > 0,4 para log K_{oc} = 2,0, quando se utiliza uma fase móvel de metanol/água nas proporções de 55/45 %.

1.7.3. **Fases móveis**

Foram ensaiadas diversas fases móveis, sendo recomendadas as duas seguintes:

— metanol/água (55/45 % v/v),

— metanol/0,01 M tampão citrato pH 6,0 (55/45 % v/v).

▼B

Na preparação do solvente de eluição, deve utilizar-se metanol com grau de pureza para HPLC e água destilada ou tampão citrato. Os gases da mistura devem ser eliminados antes da sua utilização. Deve utilizar-se uma eluição isocrática. Se o uso de misturas metanol/água não for apropriado, pode tentar utilizar-se outras misturas água/solventes orgânicos como, por exemplo, etanol/água ou acetonitrilo/ /água. Para compostos ionizáveis, é recomendada a utilização da solução tampão, de modo a estabilizar o pH. Deverão tomar-se precauções para evitar a precipitação de sais e a deterioração da coluna, que podem ocorrer com algumas misturas de fase orgânica/tampão.

Não devem ser utilizados aditivos, como reagentes de pares iónicos, uma vez que estes podem afectar as propriedades absortivas e/ou adsortivas da fase estacionária, de uma forma que poderá ser irreversível. É por esta razão obrigatório que os ensaios com aditivos sejam realizados em colunas separadas do mesmo tipo.

1.7.4. **Solutos**

Tanto as substâncias de ensaio como as de referência devem ser dissolvidas na fase móvel.

1.8. PROCEDIMENTO DO ENSAIO

1.8.1. **Condições de ensaio**

Deve ser registada a temperatura à qual se efectuam as medidas. É fortemente recomendada a utilização de um compartimento de colunas com controlo de temperatura, de modo a garantir condições de temperatura constante durante a calibração, de avaliação prévia e das medições da substância de ensaio.

1.8.2. **Determinação do tempo limite t_o**

Podem ser utilizados dois métodos diferentes na determinação do tempo limite t_o (ver também ponto 1.2).

1.8.2.1. *Determinação do tempo limite t_o através de uma série homóloga*

Este procedimento provou dar origem a valores de t_o fiáveis e padronizados. Pormenores sobre este método podem ser encontrados no método de ensaio A.8: coeficiente de partição (n-octanol/água), método de HPLC.

1.8.2.2. *Determinação do tempo limite t_0 através de substâncias inerte que não são retidas pela coluna*

Esta técnica baseia-se na injecção de soluções de formamida, ureia ou nitrato de sódio. As medições devem ser feitas, peio menos, em duplicado.

1.8.3. **Determinação dos tempos de retenção t_R**

As substâncias de referência devem ser seleccionadas de acordo com o procedimento descrito no ponto 1.3. Para determinar os respectivos tempos de retenção, podem ser injectadas misturadas desde que se tenha confirmado que o tempo de retenção de cada um dos padrões não é afectado pela presença dos outros padrões. A calibração deve ser efectuada a intervalos regulares, pelo menos duas vezes por dia, de modo a poder detectar quaisquer alterações inesperadas no comportamento da coluna. Para uma boa prática laboratorial, as injecções de calibração devem ser efectuadas antes e depois da injecção da substância de ensaio, de modo a confirmar se não houve alterações nos tempos de retenção. As substâncias de ensaio são injectadas separadamente, em quantidades o mais reduzidas possível (de modo a evitar a sobrecarga da coluna), e determinados os seus tempos de retenção.

▼B

Para aumentar o grau de confiança das medições, as determinações devem ser feitas pelo menos em duplicado. Os valores de log K_{oc} obtidos em cada medição devem manter-se numa gama de 0,25 unidades de logaritmo.

1.8.4. **Avaliação**

Os factores de capacidade k' são calculados a partir do tempo limite t_o e dos tempos de retenção t_R das substâncias de referência seleccionadas, de acordo com a equação 4 (ver ponto 1.2) Os valores de log k' das substâncias de referência são em seguida representados graficamente em função dos respectivos valores de log K_{oc}, obtidos nos ensaios em reactor descontínuo fornecidos nas tabelas 1 e 3 do apêndice. Através deste gráfico, o valor de log k' de uma substância de ensaio é então utilizado para determinar o seu valor de log K_{oc}. Se os resultados obtidos revelarem que o valor de log K_{oc} da substância de ensaio se encontra fora da curva de calibração, o ensaio deve ser repetido com outras substâncias de referência, mais adequadas.

2. **DADOS E RELATÓRIO**

O relatório deve incluir a seguinte informação:

— a identidade das substâncias de ensaio e de referência, e o seu grau de pureza e, se relevante, os respectivos valores de pK_a,

— a descrição do equipamento e das condições de funcionamento, por exmplo, o tipo e a dimensão da coluna analítica (e da coluna de protecção), os meios de detecção, a fase móvel (composição relativa e pH), a gama de temperaturas observadas durante o decorrer das medições,

— o tempo limite e o método utilizado para a sua determinação,

— as quantidades das substâncias de ensaio e de referência introduzidas na coluna,

— os tempos de retenção dos compostos de referência utilizados para a calibração,

— as características da regressão linear dos pontos experimentais (log k' em função de log K_{oc}) e um gráfico da recta obtida por regressão linear,

— os dados sobre o tempo médio de retenção e o valor estimado para log K_{oc} do composto de ensaio,

— cromatogramas.

3. **REFERÊNCIAS**

(1) W. J. Lyman, W. F. Reehl, D. H. Rosenblatt (ed). (1990). Handbook of chemical property estimation methods, Chap. 4, McGraw-Hill, New York.

(2) J. Hodson, N. A. Williams (1988). The estimation of the adsorption coefficient (K_{oc}) for soils by HPLC. Chemosphere, 17, 1-67.

(3) G. G. Briggs (1981). Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. J. Agric. Food Chem., 29, p. 1050-1059.

(4) C. T. Chiou, P. E. Porter, D.W. Schmedding (1983). Partition equilibria of nonionic organic compounds between soil organic matter and water. Environ. Sci. Technol., 17, p. 227-231.

(5) Z. Gerstl, U. Mingelgrin (1984). Sorption of organic substances by soils and sediment. J. Environm. Sci. Health, B19, p. 297-312.

▼B

(6) C. T. Chiou, L. J. Peters, V. H. Freed (1979). A physical concept of soil water equilibria for nonionic organic compounds, Science, 106, p. 831-832.

(7) S. W. Karickhoff (1981). Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils. Chemosphere, 10, p. 833-846.

(8) W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere, 35(1/2), p. 121-128.

(9) M. Mueller, W. Kördel (1996). Comparison of screening methods for the estimation of adsorption coefficients on soil. Chemosphere, 32(12), p. 2493-2504.

(10) W. Kördel, J. Stutte, G. Kotthoff (1993). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient in soil-comparison of different stationary phases, Chemosphere, 27(12), p. 2341-2352.

(11) B. von Oepen, W. Kördel, W. Klein (1991). Sorption of nonpolar and polar compounds to soils: Processes, measurements and experience with the applicability of the modified OECD Guideline 106, Chemosphere, 22, p. 28 5-304.

(12) W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (199 5). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30(7), p. 1373-1384.

▼B

Apêndice

Tabela 1

Comparação entre os valores de K_{oc} para solos e lamas de depuração e os valores calculados pelo método de HPLC ([1]), ([2])

Substância	Número CAS	Log K_{OC} lamas de depuração	Log K_{OC} HPLC	A	Log K_{OC} solos	Log K_{OC} HPLC	A
Atrazina	1912-24-9	1,66	2,14	0,48	1,81	2,20	0,39
Linurão	330-55-2	2,43	2,96	0,53	2,59	2,89	0,30
Fentião	55-38-9	3,75	3,58	0,17	3,31	3,40	0,09
Monurão	150-68-5	1,46	2,21	0,75	1,99	2,26	0,27
Fenantreno	85-01-8	4,35	3,72	0,63	4,09	3,52	0,57
Éster fenílico do ácido benzóico	93-99-2	3,26	3,03	0,23	2,87	2,94	0,07
Benzamida	55-21-0	1,60	1,00	0,60	1,26	1,25	0,01
4-Nitrobenzamida	619-80-7	1,52	1,49	0,03	1,93	1,66	0,27
Acetanilida	103-84-4	1,52	1,53	0,01	1,26	1,69	0,08
Anilina	62-53-3	1,74	1,47	0,27	2,07	1,64	0,43
2,5-Dicloroanilina	95-82-9	2,45	2,59	0,14	2,55	2,58	0,03

([1]) W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere, 35(1/2), p. 121-128.
([2]) W. Kördel, D. Hennecke, C. Franke (1997). Determination of the adsorption-coefficients of organic substances on sewage sludges.Chemosphere. 35(1/2), p. 107-119.

Tabela 2

Resultados de um ensaio comparativo interlaboratorial (11 laboratórios participantes), efectuado com o objectivo de melhorar e validar o método de HPLC ([1])

Substância	Número CAS	Log K_{OC}	K_{OC}	Log K_{OC}
		(OECD 106)	(método de HPLC)	
Atrazina	1912-24-9	1,81	78 ± 16	1,89
Monurão	150-68-5	1,99	100 + 8	2,00
Triapentenol	77608-88-3	2,37	292 ± 58	2,47
Linurão	330-55-2	2,59	465 ± 62	2,67
Fentião	55-38-9	3,31	2062 ± 648	3,31

([1]) W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30(7), p. 1373-1384.

▼B

Tabela 3

Substâncias de referência recomendadas para o método de HPLC baseado em dados de adsorção em solos

Substância de referência	Número CAS	Valores médios de log K_{OC} em reactor descontínuo	Número de valores de K_{OC}	Log desvio-padrão	Fonte
Acetanilida	103-84-4	1,25	4	0,48	(a)
Fenol	108-95-2	1,32	4	0,70	(a)
2-Nitrobenzamida	610-15-1	1,45	3	0,90	(b)
N,N-dimetilbenzamida	611-74-5	1,52	2	0,45	(a)
4-Metilbenzamida	619-55-6	1,78	3	1,76	(a)
Benzoato de metilo	93-58-3	1,80	4	1,08	(a)
Atrazina	1912-24-9	1,81	3	1,08	(c)
Isoproturão	34123-59-6	1,86	5	1,53	(c)
3-Nitrobenzamida	645-09-0	1,95	3	1,31	(b)
Anilina	62-53-3	2,07	4	1,73	(a)
3,5-Dinitrobenzamida	121-81-3	2,31	3	1,27	(b)
Carbendazim	10605-21-7	2,35	3	1,37	(c)
Triadimenol	55219-65-3	2,40	3	1,85	(c)
Triazóxido	72459-58-6	2,44	3	1,66	(c)
Triazofos	24017-47-8	2,55	3	1,78	(c)
Linurão	330-5 5-2	2,59	3	1,97	(c)
Naftaleno	91-20-3	2,75	4	2,20	(a)
Endosulfan-diol	2157-19-9	3,02	5	2,29	(c)
Metiocarbe	2032-65-7	3,10	4	2,39	(c)
Amarelo Ácido 21 9	63405-85-6	3,16	4	2,83	(a)
1,2,3-Triclorobenzeno	87-61-6	3,16	4	1,40	(a)
Y-HCH	58-89-9	3,23	5	2,94	(a)
Fentião	55-38-9	3,31	3	2,49	(c)
Vermelho Directo 81	2610-11-9	3,43	4	2,68	(a)
Pirazofos	1 3457-18-6	3,65	3	2,70	(c)
a-Endosulfan	959-98-8	4,09	5	3,74	(c)
Diclofop-metilo	51338-27-3	4,20	3	3,77	(c)
Fenantreno	85-01-8	4,09	4	3,83	(a)
Azul Básico 41 (mistura)	268 50-47-5 12270-13-2	4,89	4	4,46	(a)
DDT	50-29-3	5,63	1	—	(b)

(a) W. Kördel, J. Müller (1994). Bestimmung des Adsorptionskoeffizienten organischer Chemikalien mit der HPLC. UBA R & D Report No 106 01044 (1994).
(b) B.V. Oepen, W. Kördel, W. Klein (1991). Chemosphere, 22, p. 285-304.
(c) Dados fornecidos por entidades industriais.

▼M7

C.20. ENSAIO DE REPRODUÇÃO COM *DAPHNIA MAGNA*

INTRODUÇÃO

O presente método de ensaio é equivalente ao *Test Guideline* 211 (2012) da OCDE. As diretrizes de ensaio da OCDE são revistas periodicamente à luz dos progressos científicos. A diretriz do ensaio 211 sobre a reprodução provém do *Test Guideline* 202, parte II — ensaio de reprodução com *Daphnia* sp. (1984). Verificou-se consenso sobre a variabilidade dos dados provenientes de ensaios realizados de acordo com o método TG 202. Este facto levou a esforços consideráveis para identificar os motivos dessa variabilidade, com o objetivo de produzir um método de ensaio mais adequado. O *Test Guideline* 211 baseia-se no resultado destas atividades de investigação, ensaios interlaboratoriais e estudos de validação, realizados em 1992 (1), 1994 (2) e 2008 (3).

As principais diferenças entre a versão inicial (TG 202, de 1984) e a segunda versão (TG 211, de 1998) da diretriz de ensaio sobre a reprodução são as seguintes:

— A espécie cuja utilização se recomenda é a *Daphnia magna*;

— A duração do ensaio é de 21 dias;

— No caso dos ensaios semiestáticos, o número de animais a utilizar para cada concentração de ensaio foi diminuído de, pelo menos, 40 — de preferência divididos em quatro grupos de 10 animais — para, pelo menos, 10 animais alojados individualmente (embora se possam utilizar diferentes conceções ou modelos para os ensaios dinâmicos);

— Adotaram-se recomendações mais específicas no respeitante ao meio de ensaio e às condições de alimentação.

— As principais diferenças entre a segunda versão da diretriz de ensaio sobre a reprodução (TG 211, de 1998) e a presente versão são as seguintes:

— Foi aditado o apêndice 7, no qual se descrevem os procedimentos para a identificação do sexo dos neonatos, se necessário. Tal como nas versões anteriores do presente método de ensaio, o rácio entre os sexos é um parâmetro facultativo;

— A variável de resposta «número de descendentes vivos produzidos por animal progenitor sobrevivo» foi complementada por uma variável «reprodução da *Daphnia*» ou seja, o número total de descendentes vivos produzidos no final do ensaio por cada progenitor *Daphnia* no início do ensaio, excluindo da análise a mortalidade dos progenitores por via acidental e/ou por inadvertência. O objetivo desta variável de resposta complementar consiste em harmonizá-la com outros métodos de ensaio de reprodução com invertebrados. Além disso, esta variável permite, no que respeita ao presente método de ensaio, eliminar uma fonte de erro, a saber, o efeito da mortalidade parental involuntária e/ou acidental, caso esta ocorra no período de exposição.

— Foram incluídas diretrizes adicionais em matéria de estatística para o planeamento dos ensaios e o tratamento dos resultados, tanto para a abordagem EC_x (p. ex., EC_{10} ou EC_{50}) como para a abordagem NOEC/LOEC.

— É introduzido um ensaio no limite.

Definem-se no apêndice 1 alguns conceitos utilizados.

PRINCÍPIO DO ENSAIO

O principal objetivo do ensaio consiste em determinar o efeito de produtos químicos sobre a produção de descendência de *Daphnia magna*. Para tal, expõem-se fêmeas jovens *Daphnia* (animais progenitores), com menos de 24 horas de vida no início do ensaio, ao produto químico em estudo misturado na água, em diversas concentrações. A duração do ensaio é de 21 dias. No final do ensaio, determina-se o número total de descendentes vivos produzidos. A produção de descendência pelos animais progenitores pode expressar-se de outras formas (por exemplo, número de descendentes vivos produzidos por animal e por dia, desde

▼M7

o primeiro dia em que se observou a produção de descendência), mas essas formas devem ser descritas juntamente com o número total de descendentes vivos produzidos no fim do ensaio. Dada a conceção específica do ensaio semiestático, comparativamente com outros métodos de ensaio de reprodução com invertebrados, é também possível contar o número de descendentes vivos produzidos por cada animal progenitor. Deste modo, contrariamente a outros métodos de ensaio de reprodução com invertebrados, se o animal morrer acidental e/ou inadvertidamente durante o período de ensaio, a sua progenitura pode ser excluída da avaliação dos dados. Por conseguinte, em caso de mortalidade dos progenitores nos replicados expostos, importa ponderar se a mortalidade segue um padrão concentração-resposta: p. ex., se se observa uma regressão significativa da resposta em função da concentração do produto químico em estudo, com gradiente positivo (para tal, pode utilizar-se um teste estatístico do tipo Cochran-Armitage). Se a mortalidade não seguir um padrão concentração-resposta, os replicados com mortalidade parental devem ser excluídos da análise do resultado do ensaio. Se a mortalidade seguir um padrão concentração-resposta, a mortalidade parental deve ser atribuída a um efeito do produto químico em estudo e os replicados não devem ser excluídos da análise. Se o animal progenitor morrer durante o ensaio (quer acidentalmente — erro de manipulação, por exemplo — quer por inadvertência, devido a um incidente inexplicável não relacionado com a substância química de ensaio) ou se for um macho, o replicado é excluído do ensaio (para mais pormenores, ver ponto 51). O efeito tóxico do produto químico em estudo exprime-se ao nível da produção de descendência pelos valores ECx, efetuando, por regressão não-linear, um ajustamento dos dados obtidos a um modelo adequado, a fim de estimar a concentração que causaria x % de redução da produção de descendência ou, em alternativa, o valor NOEC ou LOEC (4). *As concentrações de ensaio devem, preferencialmente, abranger a mais baixa das concentrações com efeitos utilizadas (p. ex., EC_{10}), o que significa que o seu valor é calculado por interpolação e não por extrapolação.*

Deve também registar-se a sobrevivência dos animais progenitores e o tempo que decorreu até ao aparecimento dos primeiros juvenis. Podem ainda examinar-se outros efeitos relacionados com a substância em parâmetros como o crescimento (p. ex., comprimento) e, eventualmente, a taxa intrínseca de crescimento da população (ver ponto 44).

INFORMAÇÕES SOBRE O PRODUTO QUÍMICO EM ESTUDO

Os resultados de um ensaio de toxicidade aguda (ver capítulo C2 do presente anexo: ensaio de imobilização aguda com *Daphnia magna*) podem ser úteis para a seleção de uma gama adequada de concentrações nos ensaios de reprodução. Importa conhecer a solubilidade em água e a pressão de vapor do produto químico em estudo, devendo existir um método analítico fiável para a quantificação do produto químico nas soluções de ensaio, relativamente ao qual estejam descritos a eficiência de recuperação e o limite de determinação.

A fórmula estrutural, o grau de pureza do produto químico em estudo, a estabilidade à luz, a estabilidade nas condições do ensaio, o pKa, o P_{ow} e os resultados do ensaio de biodegradabilidade direta constituem informações relativas ao produto químico em estudo que podem ser úteis para o estabelecimento das condições do ensaio — ver capítulos C.4 (determinação da biodegradabilidade direta) e C.29 (biodegradabilidade direta — CO_2 em frascos selados) do presente anexo.

VALIDADE DO ENSAIO

Para que um ensaio seja válido, devem ser satisfeitos os seguintes critérios relativamente ao(s) controlo(s):

— a mortalidade dos animais progenitores (fêmeas de *Daphnia*) no fim do ensaio não deve exceder 20 %;

— o número médio da descendência viva, produzida por animal progenitor sobrevivente no fim do ensaio, deve ser ≥ 60.

Nota: Pode utilizar-se o mesmo critério de validade (20 %) para a mortalidade parental acidental ou por inadvertência, tanto para os controlos como para cada uma das concentrações de ensaio.

▼M7

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Material e aparelhagem

Os recipientes de ensaio e outros aparelhos que entrem em contacto com as soluções de ensaio devem ser, exclusivamente, de vidro ou outro material quimicamente inerte. Tratar-se-á, normalmente, de copos de vidro.

Por outro lado, será necessário utilizar parte ou a totalidade do seguinte equipamento:

— medidor de oxigénio (com microelétrodo ou outro equipamento adequado para a medição de oxigénio dissolvido em amostras com volume reduzido);

— aparelho adequado para o controlo da temperatura;

— medidor de pH;

— equipamento para a determinação da dureza da água;

— equipamento para a determinação da concentração de carbono orgânico total (COT) da água ou equipamento para a determinação da carência química de oxigénio (CQO);

— aparelho adequado para o controlo do regime de luz e a medição da intensidade da luz.

Organismo utilizado no ensaio

A espécie a utilizar no ensaio é *Daphnia magna* Straus ([1]).

É desejável que os clones tenham sido identificados, por genotipagem. A investigação já efetuada nesse domínio (1) demonstrou que a reprodução do clone A (proveniente do 1RCHA, em França) (5) obedece de modo sistemático ao critério de validade de uma média ≥ 60 descendentes vivos por animal progenitor sobrevivente, quando cultivado nas condições descritas no presente método de ensaio. No entanto, são aceitáveis outros clones, desde que se demonstre que a cultura de *Daphnia* satisfaz os critérios de validade para o ensaio.

No início do ensaio, os animais devem ter menos de 24 horas de vida e não fazer parte da primeira geração produzida pelo progenitor. Devem provir de uma população saudável, isto é, não evidenciar sinais de distúrbios, tais como elevada mortalidade, presença de machos e ovos de resistência (*ephippia*), atraso na primeira postura, alterações na cor, etc. O lote de animais deve ser mantido em condições de cultura (luz, temperatura, meio, alimentação e número de animais por unidade de volume) semelhantes às que se utilizarão no ensaio. Se o meio de cultura de *Daphnia* a utilizar no ensaio for diferente do utilizado para a cultura de rotina de *Daphnia*, é boa prática incluir um período de aclimatação de cerca de três semanas antes do ensaio (ou seja, uma geração) para evitar perturbações nos animais progenitores.

Meio de ensaio

Recomenda-se a utilização, neste ensaio, de um meio totalmente definido, o que permite evitar o uso de aditivos (por exemplo, algas marinhas, extrato de solo), que são difíceis de caracterizar, melhorando assim o processo de padronização entre laboratórios. Foram considerados adequados para este fim os meios Elendt M4 (6) e M7 (ver apêndice 2). São aceitáveis, porém, outros meios (ver, por exemplo, (7) e (8)), desde que as características da cultura de *Daphnia* satisfaçam os critérios de validade para o ensaio.

([1]) Podem utilizar-se outros dafniídeos, desde que satisfaçam os critérios de validade (o critério de validade relativo à produção de descendência nos controlos deve ser aplicável a *todas* as espécies). Outros dafniídeos que se utilizem devem ser claramente identificados, com justificação do seu uso.

▼M7

Se se utilizar um meio que inclua aditivos não definidos, estes terão de ser claramente especificados e o relatório do ensaio terá de incluir informações sobre a sua composição, nomeadamente no que respeita ao teor de carbono, pois este poderá contribuir para o alimento fornecido. Recomenda-se a determinação do carbono orgânico total (COT) e/ou da carência química de oxigénio (CQO) da solução de reserva do aditivo orgânico, bem como uma estimativa da contribuição resultante para os valores COT/CQO no meio de ensaio. Recomenda-se, ainda, que os níveis de COT no meio (isto é, antes da adição das algas) sejam inferiores a 2 mg/l (9).

Quando os produtos químicos contêm metais, é importante reconhecer que as propriedades do meio de ensaio (por exemplo, dureza, capacidade quelante) podem ter influência na toxicidade do produto químico de ensaio. Por esta razão, é desejável utilizar um meio cuja composição seja totalmente conhecida. Contudo, na atualidade, os únicos meios totalmente definidos que se sabe serem adequados para a cultura a longo prazo da *Daphnia magna* são os meios Elendt M4 e M7. Ambos contêm o agente quelante EDTA. Alguns estudos (2) demonstram que a «toxicidade aparente» do cádmio é geralmente menor quando o ensaio da reprodução é realizado em meios M4 e M7 do que quando é realizado num meio que não contém EDTA. Por isso, os meios M4 e M7 não são recomendados para o ensaio de produtos químicos que contenham metais, devendo igualmente ser evitados outros meios que contenham agentes quelantes. Para os produtos químicos que contenham metais, poderá ser aconselhável um meio alternativo, como, por exemplo, água dura ASTM reconstituída (9), que não contém EDTA. Esta combinação de água dura ASTM reconstituída e extrato de algas marinhas (10) é adequada para culturas de longo prazo de *Daphnia magna* (2).

A concentração de oxigénio dissolvido no início e ao longo do ensaio deve ser superior a 3 mg/l. O pH deve situar-se entre 6 e 9 e não variar mais de 1,5 unidades em nenhum ensaio. Recomenda-se uma dureza superior a 140 mg/l (expressa em $CaCO_3$). Ensaios a este nível e a níveis superiores demonstraram que, nessas condições, a produção de descendência cumpre os critérios de validade (11) (12).

Soluções utilizadas no ensaio

De modo geral, preparam-se as soluções de ensaio às concentrações escolhidas, por diluição de uma solução de reserva. As soluções de reserva devem ser preparadas, se possível, sem recurso a solventes ou dispersantes, por mistura ou agitação do produto químico em estudo no meio de ensaio, utilizando meios mecânicos como a agitação e a dispersão ultrassónica ou outros métodos adequados. É preferível que os sistemas de ensaio às concentrações do produto químico a utilizar no ensaio sejam expostos durante o tempo necessário para comprovar a estabilidade das concentrações de exposição antes da introdução dos organismos. Caso seja difícil dissolver em água o produto químico, procede-se como descrito no *Guidance Document* da OCDE sobre manipulação de substâncias difíceis (13). Deve evitar-se a utilização de solventes ou dispersantes, embora estes possam ser necessários em alguns casos, para obter uma solução de reserva com a concentração adequada para doseamento.

Além do ensaio das concentrações de exposição, deve realizar-se um ensaio de controlo da água de diluição com um número adequado de replicados e, se absolutamente necessário, um ensaio de controlo do solvente também com um número adequado de replicados. Apenas devem ser utilizados nestes ensaios solventes ou dispersantes que, comprovadamente, tenham influência mínima ou nula nas variáveis de resposta. A referência (13) contém exemplos de solventes (acetona, etanol, metanol, dimetilformamida, trietilenoglicol) e dispersantes (Cremofor RH 40, metilcelulose a 0,01 % e HCO-40) adequados. Caso se utilize um

▼M7

solvente ou dispersante, a concentração final do mesmo não pode exceder 0,1 ml/l (13) e deve ser idêntica em todos os recipientes de ensaio, exceto no grupo de controlo da água de diluição. No entanto, deve fazer-se o possível para manter a concentração do solvente a um nível mínimo.

PROCEDIMENTO DE ENSAIO

Condições de exposição

Duração

A duração do ensaio é de 21 dias.

Taxa de carga

Os animais progenitores são mantidos individualmente, um em cada recipiente de ensaio, em geral com 50-100 ml de meio em cada recipiente (no caso da *Daphnia magna*, podem utilizar-se volumes menores, em especial para os pequenos dafniídeos, como *Ceriodaphnia dubia*), exceto se o ensaio tiver de recorrer a um regime dinâmico.

Por vezes, podem ser necessários volumes maiores, de modo a cumprir os requisitos do procedimento analítico utilizado para a determinação da concentração do produto químico em estudo, embora seja também permitida a junção de replicados para análise química. Se se utilizarem volumes superiores a 100 ml, poderá ser necessário aumentar a ração fornecida às *Daphnia* de forma a assegurar uma disponibilidade adequada de alimento e o cumprimento dos critérios de validade.

Animais de ensaio

Nos ensaios semiestáticos, devem ser mantidos individualmente, pelo menos, 10 animais em cada concentração de ensaio e 10 animais nas séries de controlo.

No caso dos ensaios por escoamento, concluiu-se ser adequado dividir 40 animais em quatro grupos de 10, para cada concentração de ensaio (1). Pode ser utilizado um número menor de organismos de ensaio, recomendando-se um mínimo de 20 animais para cada concentração, repartidos por dois ou mais replicados com igual número de animais (por exemplo, quatro replicados com cinco dafniídeos cada). Convém salientar que, nos ensaios em que os animais são mantidos em grupos, não é possível excluir nenhum descendente da análise estatística caso ocorra mortalidade acidental ou por inadvertência após o início do processo reprodutivo, pelo que, nestes casos, a descendência deve ser expressa em termos de número total de descendentes vivos produzidos por cada progenitor presente no início do ensaio.

Os tratamentos (isto é, os processos de exposição) devem ser distribuídos pelos recipientes de ensaio, e todos os processos de manuseamento subsequentes devem ser efetuados de modo aleatório. O incumprimento destas recomendações pode provocar desvios nos resultados, que poderão ser erradamente interpretados como efeitos da concentração. Em particular, se as unidades experimentais forem manuseadas por ordem de exposição ou concentração, alguns efeitos dependentes do tempo, como a fadiga do operador ou outro tipo de erro, poderão ter efeitos de maior dimensão nas concentrações mais elevadas. Além disso, se houver indicações de que os resultados do ensaio podem ser afetados por uma condição inicial ou ambiental do ensaio, como a localização no laboratório, deve considerar-se a possibilidade de efetuar o ensaio por agrupamento de recipientes.

Alimentação

Nos ensaios semiestáticos, a alimentação deve ser fornecida de preferência diariamente mas, no mínimo, três vezes por semana (isto é, correspondendo às mudanças de meio). Deve ser tida em conta a possível diluição das concentrações de exposição devido à adição dos alimentos, diluição essa que deve ser evitada tanto quanto possível, por recurso a suspensões concentradas de algas. Qualquer desvio em relação a essa norma (por exemplo, em ensaios por escoamento) deve ser indicado no relatório.

Durante o ensaio, a dieta dos animais progenitores deve consistir, de preferência, em células de algas vivas de uma ou mais das seguintes espécies: *Chlorella* sp., *Pseudokirchneriella subcapitata* (anteriormente *Selenastrum capricornutum*) e *Desmodesmus subspicatus* (anteriormente *Scenedesmus subspicatus*). A dieta fornecida deve basear-se na quantidade do carbono orgânico (C) fornecida a cada animal progenitor. Os dados da investigação já realizada nesta área (14) demonstram que, no caso da *Daphnia magna*, níveis de ração entre 0,1 e 0,2 mg C/*Daphnia*/dia são suficientes para atingir o número de descendentes que satisfaz

▼M7

o critério de validade do ensaio. A ração pode ser fornecida a taxa constante ao longo de todo o período do ensaio; se for desejável, pode utilizar-se no início uma taxa inferior, que depois se aumentará durante o ensaio em atenção ao crescimento dos animais progenitores. Neste caso, a ração deve manter-se dentro da gama recomendada de 0,1 a 0,2 mg C/*Daphnia*/dia.

Se se efetuarem medições alternativas, tais como o número de células de algas ou a absorvância, para determinar a quantidade de ração necessária (por razões de conveniência, uma vez que as medições do teor de carbono são muito mais morosas), cada laboratório deve produzir o seu próprio nomograma em que relacione a medida alternativa com o conteúdo em carbono da cultura de algas (ver apêndice 3 para conselhos sobre a elaboração do nomograma). Os nomogramas devem ser verificados, pelo menos, anualmente; e com maior frequência se tiverem sido alteradas as condições de cultura das algas. Verificou-se que a absorvância é uma medida alternativa mais adequada do que o número de células, para determinar o teor de carbono (15).

De modo a minimizar o volume do meio de cultura de algas transferido para os recipientes de ensaio, a suspensão de algas fornecida às *Daphnia* deve ser concentrada. A concentração das algas pode ser efetuada por centrifugação, seguida de ressuspensão em meio de cultura de *Daphnia*.

Luz

Período de exposição à luz: 16 horas, com uma intensidade não superior a 15-20 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, medida à superfície da água do recipiente. No caso dos instrumentos de medição da luz calibrados em lux, uma gama equivalente a 1 000--1 500 lux para a luz branca corresponde aproximadamente à intensidade luminosa recomendada de 15-20 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$.

Temperatura

A temperatura do meio de ensaio deve situar-se entre 18 e 22 °C. No entanto, independentemente do tipo de ensaio, a temperatura não deve, se possível, variar mais de 2 °C em relação a estes limites (por exemplo, 18-20, 19-21 ou 20-22 °C) como intervalo diário. Poderá ser vantajoso utilizar um recipiente de ensaio adicional para a monitorização da temperatura.

Arejamento

Os recipientes de ensaio não devem ser arejados durante o ensaio.

Planeamento do ensaio

Ensaio de determinação de concentrações

Se necessário, realiza-se um ensaio exploratório com, por exemplo, cinco concentrações do produto químico em estudo e dois replicados, por cada exposição e controlo. Para decidir acerca das concentrações a utilizar neste ensaio exploratório, pode ser útil dispor de informações adicionais acerca da toxicidade aguda para espécies *Daphnia* e/ou outros organismos aquáticos, provenientes de ensaios de produtos químicos semelhantes ou de referências.

A duração do ensaio de determinação de concentrações é de 21 dias ou, em alternativa, um período suficiente para prever com fiabilidade a intensidade dos efeitos. No final do ensaio, avalia-se a reprodução da *Daphnia*. Deve registar-se o número de progenitores e a presença de descendentes.

Ensaio definitivo

Normalmente, devem ser testadas pelo menos cinco concentrações de ensaio — abrangendo a concentração efetiva (p. ex., EC_x) — dispostas numa série geométrica com um fator de separação que não exceda, de preferência, 3,2. Deve utilizar-se um número de replicados apropriado para cada concentração de ensaio (ver pontos 24 e 25). A eventual utilização de menos de cinco concentrações deve ser justificada. Os produtos químicos não devem ser ensaiados acima do seu

▼M7

limite de solubilidade no meio de ensaio. Antes de se realizar o ensaio, é desejável ponderar a representatividade estatística da sua conceção e utilizar métodos estatísticos adequados (4). Na escolha da gama de concentrações, importa ter presente o seguinte:

i) Se se estimar a EC_x em relação aos efeitos na reprodução, é aconselhável utilizar concentrações suficientes para definir este parâmetro com um nível de confiança apropriado. As concentrações de ensaio devem, de preferência, abranger a EC_x estimada, para que esta seja determinada por interpolação e não por extrapolação. Para a análise estatística subsequente, é vantajoso dispor de mais concentrações de ensaio (p. ex., 10) e um menor número de replicados de cada concentração (p. ex., 5, mantendo, assim, constante o número total de recipientes) e 10 controlos.

ii) Ao estimar a LOEC e/ou a NOEC, a concentração de ensaio mínima deve ser suficientemente baixa para que a fecundidade a essa concentração não seja significativamente inferior à do controlo. Se não for este o caso, o ensaio deve ser repetido, baixando a concentração de ensaio mínima.

iii) Ao estimar a LOEC e/ou a NOEC, a concentração de ensaio máxima deve ser suficientemente elevada para que a fecundidade a essa concentração seja significativamente inferior à do controlo. Se não for este o caso, o ensaio deve ser repetido elevando a concentração de ensaio máxima, salvo se, no ensaio inicial, foi utilizada, como concentração de ensaio máxima, a concentração máxima de ensaio necessária para o ensaio dos efeitos crónicos (ou seja, 10 mg/l).

Se não se observarem efeitos com a concentração máxima (p. ex., 10 mg/l) no ensaio de determinação de concentrações ou se for muito provável que o produto químico em estudo tenha uma toxicidade baixa ou nula, com base na ausência de toxicidade em outros organismos e/ou numa absorção baixa ou nula, o ensaio da reprodução pode ser executado como ensaio no limite, utilizando uma concentração de, p. ex., 10 mg/l, além do controlo. Devem utilizar-se dez replicados, tanto para os grupos de exposição como para os grupos de controlo. Se se afigurar necessário um ensaio no limite com um sistema por escoamento, podem utilizar-se menos replicados. Um ensaio no limite representa a oportunidade para demonstrar a inexistência de efeito estatisticamente significativo na concentração--limite; contudo, se se se registarem efeitos, é necessário, em geral, um ensaio completo.

Grupos de controlo

A par das séries de ensaio, deve ser realizada uma série de ensaios de controlo do meio e também, se aplicável, uma série de controlo com o solvente ou dispersante. Se se utilizarem solventes ou dispersantes, a sua concentração deve ser igual à utilizada nos recipientes com o produto químico em estudo. Deve utilizar-se um número adequado de replicados (ver pontos 23 e 24).

Em geral, num ensaio bem realizado, o coeficiente de variação relativamente ao número médio de descendentes vivos produzidos por cada animal progenitor no(s) controlo(s) deve ser $\leq$ 25 %, o que deve ser incluído nos planos de ensaio que utilizem animais mantidos individualmente.

Renovação do meio de ensaio

A frequência da renovação do meio depende da estabilidade do produto químico em estudo, mas deve ser, no mínimo, de três vezes por semana. Se, com base em ensaios de estabilidade preliminares (ver ponto 7), a concentração do produto químico em estudo não for estável (isto é, se se situar fora da gama de 80-120 % do valor nominal ou abaixo de 80 % da concentração inicial medida) durante o período máximo de renovação (isto é, três dias), deve ponderar-se uma renovação mais frequente do meio ou um ensaio por escoamento.

▼M7

Nos ensaios semiestáticos, quando o meio é renovado, deve preparar-se uma segunda série de recipientes de ensaio para onde se transferem os animais progenitores, utilizando, por exemplo, uma pipeta de vidro de diâmetro adequado. O volume do meio transferido com as *Daphnia* deve ser mínimo.

Exames

Os resultados das observações durante o ensaio devem ser registados em folhas de dados (ver exemplos nos apêndices 4 e 5). Se se exigirem outras medições (ver ponto 44), poderão ser necessárias observações adicionais.

Descendência

Os descendentes produzidos por cada animal progenitor devem ser retirados e contados, de preferência diariamente desde o aparecimento dos primeiros juvenis, para evitar que estes consumam o alimento destinado ao progenitor. Embora, para atingir o objetivo deste método de ensaio, seja apenas necessário contar o número de descendentes vivos, também deve ser indicada no relatório a presença de ovos abortados ou de descendentes mortos.

Mortalidade

A mortalidade entre os animais progenitores deve ser registada diariamente ou, no mínimo, sempre que se proceda à contagem dos descendentes.

Outros parâmetros

Embora o presente método de ensaio seja planeado sobretudo para avaliar os efeitos na produção de descendência, poderão também ser suficientemente quantificados outros efeitos, de modo a permitir uma análise estatística. Pode registar-se a produção de descendência por animal progenitor sobrevivente, isto é, o número de descendentes vivos produzidos durante o ensaio por cada progenitor sobrevivo. Este dado pode ser comparado com a principal variável de resposta (produção de descendência por animal progenitor presente no início do ensaio que não tenha morrido por inadvertência ou acidentalmente durante o ensaio). Em caso de mortalidade dos progenitores nos replicados expostos, importa ponderar se esta segue um padrão concentração-resposta: p. ex., se se observa uma regressão significativa da resposta em função da concentração do produto químico em estudo, com gradiente positivo (para tal, pode utilizar-se um teste estatístico do tipo Cochran-Armitage). Se a mortalidade não seguir um padrão concentração-resposta, os replicados com mortalidade parental devem ser excluídos da análise do resultado do ensaio. Se a mortalidade seguir um padrão concentração-resposta, a mortalidade parental deve ser atribuída a um efeito do produto químico em estudo e os replicados não devem ser excluídos da análise dos resultados do ensaio. São desejáveis medições do crescimento, pois fornecem informação sobre possíveis efeitos subletais, que podem ser úteis em complemento das medições simples de reprodução. Recomenda-se a medição do comprimento dos animais progenitores (isto é, o comprimento do corpo, excluindo o espinho anal) no final do ensaio. O tempo necessário para a produção da primeira geração (e das seguintes), o número e a dimensão das gerações por animal progenitor, o número de ovos abortados, a presença de machos neonatos (OCDE, 2008) ou de ovos de repouso (*ephippia*) e, eventualmente, a taxa intrínseca de crescimento da população são outros parâmetros que podem ser medidos ou calculados (ver apêndice 1, para a definição, e apêndice 7, para a identificação do sexo dos neonatos).

Frequência das medições e determinações analíticas

Pelo menos uma vez por semana, deve medir-se a concentração de oxigénio, a temperatura, o grau de dureza e os valores de pH nos meios frescos e usados, nos controlo(s) e na maior concentração do produto químico em estudo.

Durante o ensaio, determinam-se a intervalos regulares as concentrações do produto químico em estudo.

Nos ensaios semiestáticos, em que a concentração do produto químico em estudo se deve manter a ± 20 % do valor nominal (isto é, na gama 80-120 % — ver pontos 6, 7 e 39), recomenda-se que, no mínimo, sejam analisadas a maior e a menor concentrações de ensaio quando acabadas de preparar e uma vez durante a

▼M7

primeira semana do ensaio, na altura da renovação do meio (isto é, devem ser efetuadas análises numa amostra da solução no momento em que esta é preparada e no momento da renovação do meio). Em seguida, essas determinações devem ser repetidas, pelo menos, a intervalos semanais.

Para os ensaios em que não se espera que a concentração do produto químico em estudo se mantenha a ± 20 % do valor nominal, é necessário analisar todas as concentrações de ensaio, no momento em que são preparadas e na altura da renovação do meio. No entanto, para os ensaios em que a concentração inicial medida do produto químico em estudo não se encontra no intervalo de ± 20 % do valor nominal, mas em que é possível fornecer provas suficientes de que as concentrações iniciais são reprodutíveis e estáveis (isto é, mantêm-se na gama 80-120 % das concentrações iniciais), as determinações químicas podem ser reduzidas nas semanas segunda e terceira do ensaio, limitando-se às concentrações maior e menor. Em todos os casos, a determinação das concentrações do produto químico em estudo antes da renovação do meio só precisa de ser efetuada no recipiente de um dos replicados, para cada concentração de ensaio.

Se se efetuar um ensaio com escoamento, é adequado aplicar um método de amostragem semelhante ao descrito para os ensaios semiestáticos (não sendo, neste caso, aplicável a medição de soluções usadas). Pode, porém, ser aconselhável aumentar o número de amostragens durante a primeira semana (efetuando três conjuntos de medições, por exemplo), de modo a assegurar que as concentrações de ensaio se mantêm estáveis. Nestes tipos de ensaio, a taxa de fluxo do diluente e do produto químico em estudo deve ser verificada diariamente.

Se houver provas de que, durante o ensaio, a concentração do produto químico em estudo não excedeu ± 20 % da concentração nominal ou da concentração inicial medida, os resultados podem basear-se nos valores nominais ou iniciais medidos. Se o desvio em relação à concentração nominal ou à concentração inicial medida for superior a ± 20 %, os resultados devem ser expressos em termos de média ponderada em função do tempo (ver diretrizes de cálculo no apêndice 6).

RESULTADOS E RELATÓRIO

Tratamento dos resultados

O objetivo do ensaio consiste em determinar os efeitos do produto químico em estudo na produção de descendência. Deve calcular-se o número total de descendentes vivos por animal progenitor, em cada recipiente de ensaio (isto é, em cada replicado). Por outro lado, a reprodução pode ser determinada com base na produção de descendentes vivos pelo progenitor sobrevivo. No entanto, a variável de resposta mais pertinente do ponto de vista ecológico é o número total de descendentes vivos produzidos por cada animal progenitor que não morra acidental ([1]) ou inadvertidamente ([2]) durante o ensaio. Se o progenitor morrer acidental ou inadvertidamente durante o ensaio ou for um macho, o replicado é excluído da análise. A análise basear-se-á então num número reduzido de replicados. Em caso de mortalidade dos progenitores nos replicados expostos, importa ponderar se esta segue um padrão concentração-resposta: p. ex., se se observa uma regressão significativa da resposta em função da concentração do produto químico em estudo, com gradiente positivo (para tal, pode utilizar-se um teste estatístico do tipo Cochran-Armitage). Se a mortalidade não seguir um padrão concentração-resposta, os replicados com mortalidade parental devem ser excluídos da análise do resultado do ensaio. Se a mortalidade seguir um padrão concentração-resposta, a mortalidade parental deve ser atribuída a um efeito do produto químico em estudo e os replicados não devem ser excluídos da análise dos resultados do ensaio.

Em resumo, se se utilizarem a LOEC e a NOEC ou a EC_x para exprimir os efeitos, recomenda-se que o cálculo destes na reprodução recorra a ambas as variáveis de resposta supramencionadas, ou seja,

([1]) Mortalidade acidental: mortalidade não relacionada com o produto químico, de origem acidental (ou seja, causa conhecida)

([2]) Mortalidade por inadvertência: mortalidade não relacionada com o produto químico, com causa desconhecida

▼M7

— o número total de descendentes vivos produzidos por cada animal progenitor que não morra acidental ou inadvertidamente durante o ensaio.

— o número de descendentes vivos produzidos por cada animal progenitor sobrevivo;

e utilizar como resultado final o valor mais baixo de LOEC e NOEC ou da EC_x, calculado com base nestas duas variáveis de resposta.

Antes de efetuar a análise estatística (p. ex., mediante procedimentos ANOVA ou a comparação entre as exposições e os controlos, por testes t-Student, de Dunnett, de Williams, ou pelo teste descendente de Jonckheere-Terpstra), é recomendável ponderar a transformação dos dados, se tal for necessário ao cumprimento dos requisitos do ensaio estatístico. Como alternativas não-paramétricas, podem utilizar-se os testes de Dunn ou de Mann-Whitney. Calculam-se os intervalos de confiança a 95 % para as médias correspondentes a cada nível de exposição.

O número de progenitores sobreviventes nos grupos de controlo não expostos ao produto químico em estudo constitui um critério de validação, sendo necessário registá-lo e referi-lo no relatório. Também devem constar do relatório final quaisquer outros efeitos negativos, como comportamentos anormais e constatações toxicológicas significativas.

ECx

Calculam-se os valores de EC_x, assim como os correspondentes limites de confiança superior e inferior, recorrendo a métodos estatísticos adequados (função logística ou de Weibull, método simplificado de Spearman-Karber ou interpolação simples). Para calcular a EC_{10}, a EC_{50} ou qualquer outra EC_x, procede-se a uma análise de regressão da série completa de dados.

NOEC/LOEC

Se a análise estatística tiver por objetivo determinar a NOEC/LOEC, devem utilizar-se métodos estatísticos adequados, de acordo com o documento n.º 54 da OCDE intitulado *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application* (4). Em geral, investigam-se os efeitos adversos do produto químico em estudo, comparativamente ao grupo de controlo, efetuando testes de Pode testar-se a normalidade da distribuição e a homogeneidade da variância recorrendo a um teste estatístico adequado: por exemplo, o teste de Shapiro-Wilk e o teste de Levene, respetivamente ($p \leq 0,05$).

Podem também efetuar-se uma análise ANOVA unifatorial e os subsequentes testes de múltiplas comparações. Pode recorrer-se a múltiplas comparações (p. ex., o teste de Dunnett) ou a testes de tendência regressivos (p. ex., o teste de Williams ou o teste descendente de Jonckheere-Terpstra) para determinar se há diferenças com significância estatística ($p \leq 0,05$) entre os grupos de controlo e as diversas concentrações do produto químico em estudo — para escolher o teste recomendado, consultar o documento n.º 54 da OCDE (4). Alternativamente, pode recorrer-se a métodos não-paramétricos (por exemplo, o teste U com ajustamento de Bonferroni-Holm ou o teste de tendência de Jonckheere-Terpstra) para determinar a NOEC e a LOEC.

Ensaio no limite

Caso se tenha realizado um ensaio no limite (comparação do grupo de controlo unicamente com um nível de exposição) e estejam preenchidos os requisitos para a realização de testes paramétricos (no tocante a normalidade e a homogeneidade), pode efetuar-se uma avaliação das respostas mensuráveis recorrendo ao teste t de Student. Se estes requisitos não forem preenchidos, pode recorrer-se a um teste t de variância desigual (como o teste de Welch) ou a um teste não-paramétrico, como o teste U de Mann-Whitney.

Para verificar se há diferenças com significância entre grupos de controlo (grupo de controlo e grupo de controlo do solvente ou dispersante), pode efetuar-se um teste aos replicados de cada grupo de controlo, como se explicou para o ensaio no limite. Caso os testes realizados não detetem diferenças com significância estatística, podem agregar-se todos os replicados do grupo de controlo e do grupo de controlo do solvente. Caso contrário, é necessário comparar cada nível de exposição com o grupo de controlo do solvente.

▼M7

Relatório de ensaio

O relatório do ensaio deve incluir o seguinte:

Produto químico em estudo:

— natureza física e propriedades físico-químicas relevantes;

— dados relativos à identificação química, incluindo a pureza.

Espécies sujeitas a ensaio:

— clone (quer tenha sido ou não geneticamente identificado), fornecedor ou fonte (se conhecidos) e condições de cultura utilizadas. Deve registar-se e justificar-se a eventual utilização de uma espécie diferente da *Daphnia magna*.

Condições de realização do ensaio:

— método de ensaio utilizado (por exemplo, semiestático ou por escoamento, o volume, a carga expressa em número de espécimes *Daphnia* por litro),

— fotoperíodo e intensidade da luz;

— plano do ensaio (por exemplo: número de replicados, número de progenitores por replicado);

— dados pormenorizados sobre o meio de cultura utilizado;

— eventuais adições de material orgânico, incluindo a composição, a fonte, o método de preparação, o COT/CQO de preparações de reserva, a estimativa do COT/CQO resultante no meio de ensaio;

— dados pormenorizados sobre a alimentação, incluindo as quantidades (em mg C/*Daphnia*/dia) e a descrição (por exemplo: tipo de alimento(s), incluindo, para as algas, o nome específico (a espécie) e, se conhecidas, a estirpe e as condições de cultura),

— método de preparação das soluções de reserva e frequência de renovação do meio (devem fornecer-se as concentrações do solvente ou dispersante eventualmente utilizado).

Resultados:

— resultados de quaisquer estudos preliminares sobre a estabilidade do produto químico em estudo;

— valor nominal das concentrações de ensaio e resultados de todas as análises para determinar a concentração do produto químico em estudo nos recipientes de ensaio (ver exemplo de folha de dados no apêndice 5); também devem registar-se a eficiência de recuperação do método e o limite de determinação;

— qualidade da água nos recipientes de ensaio (isto é, o pH, a temperatura e a concentração de oxigénio dissolvido, assim como o COT e/ou a CQO e a dureza, quando aplicável) (ver exemplo de folha de dados no apêndice 4);

— registo completo da produção de descendência viva por cada animal progenitor, durante o ensaio (ver exemplo nas folhas de dados do apêndice 4),

— número de animais progenitores mortos e data da morte (ver exemplo de folha de dados no apêndice 4);

— coeficiente de variação da produção de descendência no controlo (com base no número total de descendentes vivos por animal progenitor vivo no fim do ensaio);

— representação gráfica do número total de descendentes vivos produzidos por animal progenitor em cada replicado (com exclusão de qualquer animal progenitor que possa ter morrido acidental ou inadvertidamente durante o ensaio), em função da concentração do produto químico;

▼M7

— se pertinente, representação gráfica do número total de descendentes vivos produzidos por cada animal progenitor sobrevivente em cada replicado, em função da concentração do produto químico;

— se pertinente, a menor concentração com efeito observável (LOEC) na reprodução, incluindo uma descrição dos métodos estatísticos utilizados, uma indicação da dimensão do efeito que se prevê detetar (para tal, pode efetuar-se uma análise da representatividade estatística antes do início do ensaio) e a concentração sem efeito observável (NOEC) na reprodução; se for caso disso, devem também especificar-se a variável de resposta utilizada para calcular o valor da LOEC e da NOEC (número total de descendentes vivos por organismo materno que não tenha morrido acidental ou inadvertidamente durante o ensaio ou número total de descendentes vivos por organismo materno sobrevivo), bem como a LOEC e a NOEC respeitantes à mortalidade dos animais progenitores;

— quando pertinente, o valor EC_x para a reprodução, os intervalos de confiança (p. ex., 90 % ou 95 %), um gráfico do modelo ajustado que se utilizou para o seu cálculo, o declive da curva concentração-resposta e o seu desvio-padrão;

— outras medições ou efeitos biológicos observados: descrição de qualquer outro efeito biológico que tenha sido observado ou medido (por exemplo, crescimento de animais progenitores), incluindo qualquer justificação apropriada;

— uma explicação para qualquer desvio do método de ensaio.

REFERÊNCIAS

1) *Test Guidelines Programme* da OCDE. Report of the Workshop on the *Daphnia magna* Pilot Ring Test, Sheffield University, U.K., 20-21 March 1993.

2) OCDE (1997). Report of the Final Ring Test of the *Daphnia magna* Reproduction Test. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.6. OECD, Paris.

3) OCDE (2008). Validation report for an enhancement of OECD TG 211 *Daphnia magna* reproduction test. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, No.88. OECD, Paris.

4) OCDE (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment Number 54. OECD, Paris.

5) Baird, D.J., *et al*. (1991). A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna* Straus. Ecotox. and Environ. Safety, 21, 257-265.

6) Elendt, B.-P. (1990). Selenium deficiency in Crustacea; An ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154, 25-33.

7) EPA (2002). Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. Fifth Edition. EPA/ /821/R-02/012. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water, Washington, DC. www.epa.gov/waterscience/methods

8) Vigano, L. (1991). Suitability of commercially available spring waters as standard medium for culturing *Daphnia magna*. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 47, 775-782.

9) ASTM. (2008) Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. In: Annual Book of ASTM Standards; Water and Environmental Technology, vol. 11.04; ASTM E729 — 96 (2007) American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA

10) Baird, D.J., *et al*. (1989). The long term maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicological tests; problems and prospects. In: Proceedings of the 1st European Conference on Ecotoxicology. Copenhagen 1988. (H. Løkke, H. Tyle and F. Bro-Rasmussen. Eds.) pp 144-148.

▼M7

11) Parkhurst, B.R., J.L Forte. And G.P. and Wright (1981) Reproducibility of a life-cycle toxicity test with *Daphnia magna*. Bull. Environ. Contam. and Toxicol., 26: 1-8.

12) Cowgill, U.M. and Milazzo, D.P. (1990). The sensitivity of two cladocerans to water quality variables: salinity and hardness. Arch. Hydrobiol., 120 (2): 185-196.

13) OCDE (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23. OECD, Paris.

14) Sims, I.R., S. Watson. and D. Holmes (1993) Toward a standard *Daphnia* juvenile production test. Environ. Toxicol. and Chem., 12, 2053-2058.

15) Sims, I. (1993). Measuring the growth of phytoplankton: the relationship between total organic carbon with three commonly used parameters of algal growth. Arch. Hydrobiol., 128, 459-466.

▼M7

Apêndice 1

DEFINIÇÕES

Aplicam-se neste método de ensaio as seguintes definições:

Mortalidade acidental: mortalidade não relacionada com o produto químico, de origem acidental (ou seja, sem causa conhecida).

Produto químico: Substância ou mistura.

Ecx: a concentração do produto químico em estudo dissolvido em água que provoca uma redução de x % na reprodução dos espécimes de *Daphnia*, durante um período de exposição definido.

Mortalidade por inadvertência: mortalidade não relacionada com o produto químico, de causa desconhecida

Taxa intrínseca de crescimento da população: medida do crescimento da população que integra a produção de descendência e a mortalidade específica da idade (1) (2) (3). Nas populações estáveis, é igual a zero. Nas populações em crescimento, o seu valor será positivo; nas populações em declínio, será negativo. Manifestamente, a última situação não é sustentável e, em última análise, conduzirá à extinção.

Limite de deteção: a menor concentração que pode ser detetada, mas não quantificada.

Limite de determinação: a menor concentração que pode ser medida de forma quantitativa.

Menor concentração com efeito observável (LOEC): a menor concentração testada em que o produto químico produz um efeito observável estatisticamente significativo sobre a reprodução e a mortalidade dos progenitores (a $p < 0,05$), comparativamente ao controlo, durante um período de exposição definido. No entanto, todas as concentrações de ensaio superiores à LOEC devem ter efeito nocivo igual ou superior ao verificado para a LOEC. Quando estas duas condições não puderem ser satisfeitas, deve ser fornecida uma explicação pormenorizada sobre a forma como se determinou a LOEC (e, consequentemente, a NOEC).

Mortalidade: um animal é considerado morto quando permanece imóvel, isto é, quando não é capaz de nadar ou quando não se observa movimento dos apêndices ou do pós-abdómen num intervalo de 15 segundos após agitação suave do recipiente de ensaio (deve ser mencionada outra definição que se utilize, juntamente com a sua referência).

Concentração sem efeitos observáveis (NOEC): a concentração ensaiada imediatamente abaixo da LOEC, que, quando comparada com o controlo, não tem efeito estatisticamente significativo ($p < 0,05$), durante um período de exposição definido.

Progenitura: os juvenis do género *Daphnia* produzidos pelos animais progenitores no decorrer do ensaio.

Animais progenitores: as fêmeas do género *Daphnia* presentes no início do ensaio e cuja produção de descendência é o objeto do estudo.

Produção de descendência: o número de descendentes vivos produzidos por animais progenitores durante o período de ensaio.

Produto químico em estudo: qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado este método de ensaio.

Bibliografia

1) Wilson, E.O. and Bossert, W.H. (1971). A Primer of Population Biology. Sinauer Associates Inc. Publishers.

▼M7

2) Poole, R.W. (1974). An Introduction to quantitative Ecology. Mc Graw Hill Series in Population Biology, New York, p 532.

3) Meyer, J. S., Ingersoll, C. G., McDonald, L.L. and Boyce, M.S. (1986). Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs bootstrap techniques. Ecology, 67, 1156-1166.

▼M7

Apêndice 2

PREPARAÇÃO DOS MEIOS TOTALMENTE DEFINIDOS ELENDT M7 E M4

Aclimatação aos meios Elendt M7 e M4

Alguns laboratórios tiveram dificuldades na transferência direta de espécimes *Daphnia* para os meios M4 (1) e M7. No entanto, obteve-se algum sucesso com uma aclimatação gradual, isto é, transferindo do próprio meio para Elendt a 30 %, a 60 % e, por fim, a 100 %. Os períodos de aclimatação necessários podem atingir a duração de um mês.

Preparação

Elementos vestigiais

Em primeiro lugar, preparam-se soluções de reserva separadas (I) de elementos vestigiais individuais em água com um grau de pureza adequado: por exemplo, desionizada, destilada ou submetida a osmose inversa. A partir destas soluções de reserva individuais (I), é preparada uma segunda solução de reserva simples (II), que contém todos os elementos vestigiais (solução combinada), isto é:

Solução ou soluções de reserva I (substância simples)	Quantidade adicionada à água	Concentração (em relação ao meio M4)	Para preparar a solução de reserva combinada II, adicionar a seguinte quantidade de solução de reserva I à água	
	mg/l		ml/l	
			M 4	M 7
H_3BO_3	57 190	20 000 vezes	1,0	0,25
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$	7 210	20 000 vezes	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000 vezes	1,0	0,25
RbCl	1 420	20 000 vezes	1,0	0,25
$SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$	3 040	20 000 vezes	1,0	0,25
NaBr	320	20 000 vezes	1,0	0,25
$MoNa_2O_4 \cdot 2\ H_2O$	1 260	20 000 vezes	1,0	0,25
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	335	20 000 vezes	1,0	0,25
$ZnCl_2$	260	20 000 vezes	1,0	1,0
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	200	20 000 vezes	1,0	1,0
KI	65	20 000 vezes	1,0	1,0
Na_2SeO_3	43,8	20 000 vezes	1,0	1,0
NH_4VO_3	11,5	20 000 vezes	1,0	1,0
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	5 000	2 000 vezes	—	-
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	1 991	2 000 vezes	—	-
Ambas as soluções de Na_2EDTA e $FeSO_4$ são preparadas individualmente, juntas e imediatamente autoclavadas, o que dá:				
solução Fe-EDTA		1 000 vezes	20,0	5,0

▼**M7**

Meios M4 e M7

Os meios M4 e M7 são preparados utilizando a solução de reserva II, os macronutrientes e as vitaminas, tal conforme a seguir se indica:

	Quantidade adicionada à água	Concentração (em relação ao meio M4)	Quantidade de solução de reserva adicionada para preparar o meio	
	mg/l		ml/l	
			M 4	M 7
Soluções de reserva II (combinação de elementos vestigiais)		20 vezes	50	50
Soluções-padrão de macronutrientes (uma só substância)				
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	293 800	1 000 vezes	1,0	1,0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246 600	2 000 vezes	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000 vezes	0,1	0,1
$NaHCO_3$	64 800	1 000 vezes	1,0	1,0
$Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$	50 000	5 000 vezes	0,2	0,2
$NaNO_3$	2 740	10 000 vezes	0,1	0,1
KH_2PO_4	1 430	10 000 vezes	0,1	0,1
K_2HPO_4	1 840	10 000 vezes	0,1	0,1
Solução de reserva de vitaminas	-	10 000 vezes	0,1	0,1

A solução-padrão de vitaminas prepara-se juntando as três vitaminas a 1 litro de água, conforme a seguir se indica:

	mg/l			
Cloridrato de tiamina	750	10 000 vezes		
Cianocobalamina (B_{12})	10	10 000 vezes		
Biotina	7,5	10 000 vezes		

A solução de reserva de vitaminas é armazenada e congelada em pequenas alíquotas. As vitaminas são adicionadas ao meio imediatamente antes da utilização.

Nota: Para evitar a precipitação dos sais quando se prepara o meio completo, adicionar as alíquotas de soluções de reserva a cerca de 500-800 ml de água desionizada e perfazer até 1 litro.

N.N.B. A primeira publicação relativa ao meio M4 tem a seguinte referência: Elendt, B.P (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154, 25-33.

▼M7

Apêndice 3

ANÁLISE DO CARBONO ORGÂNICO TOTAL (COT) E PRODUÇÃO DE UM NOMOGRAMA PARA O TEOR COT DAS ALGAS QUE SERVEM DE ALIMENTO

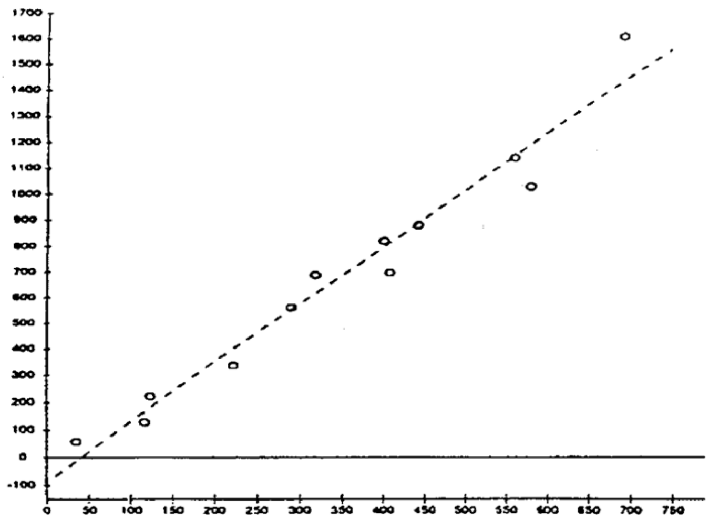
Reconhece-se que o teor de carbono das algas que servem de alimento não será normalmente medido diretamente, mas sim através de correlações (isto é, nomogramas) com medições alternativas, tais como o número de células de algas ou a absorvância.

O COT deve ser medido por oxidação a alta temperatura, em vez de se utilizarem métodos com UV ou persulfato (ver: The Instrumental Determination of Total Organic Carbon, Total Oxygen Demand and Related Determinands 1979, HMSO 1980; 49 High Holborn, London WC1V 6HB).

Para a elaboração do nomograma, as algas devem ser separadas do meio de crescimento por centrifugação, seguida de ressuspensão em água destilada. Medir o parâmetro de substituição e a concentração de COT em cada amostra em triplicado. Devem ser analisados brancos de água destilada, e a concentração de COT deve ser deduzida a partir da concentração de COT presente na amostra de algas.

Os nomogramas devem ser lineares em toda a gama de concentrações de carbono necessária. Indicam-se a seguir alguns exemplos.

N.B. Estes exemplos não devem ser aproveitados para efetuar conversões; é essencial que os laboratórios preparem os seus próprios nomogramas.



Chlorella vulgaris var. *viridis* (CCAP 211/12).

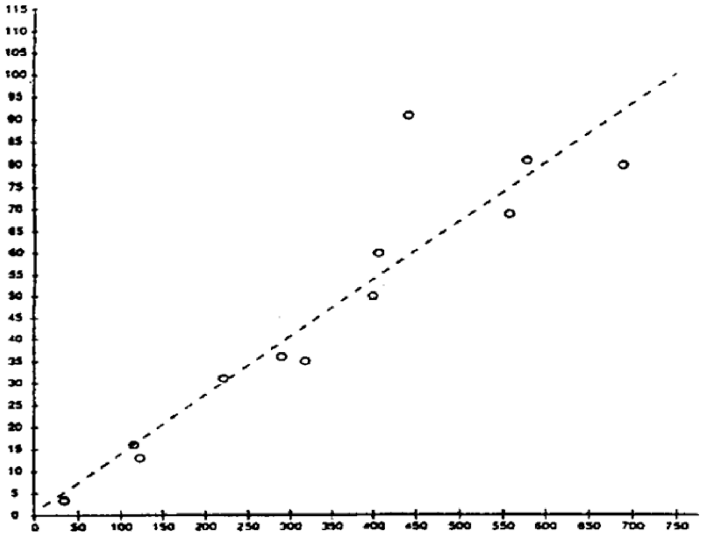
Regressão de mg/l (peso seco) em mg C/1. Dados obtidos a partir de suspensões concentradas de células cultivadas em sistema semicontínuo, ressuspensas em água destilada

Eixo das abcissas: mg C/l de algas concentradas utilizadas como alimento

Eixo das ordenadas: mg/l de massa seca de algas concentradas utilizadas como alimento

Coeficiente de correlação -0,980

▼**M7**



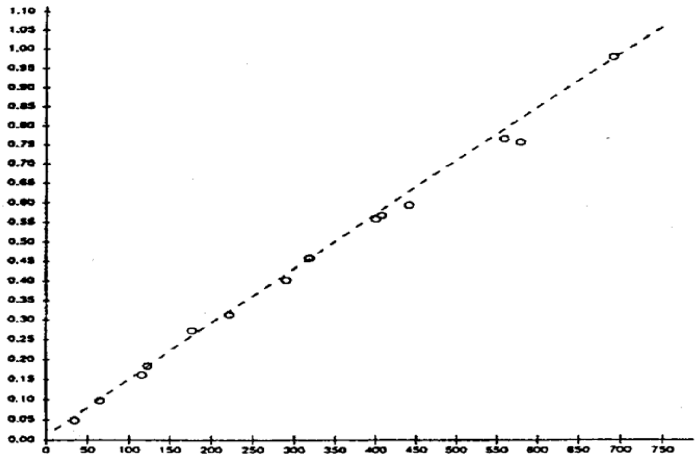
Chlorella vulgaris var. *viridis* (CCAP 211/12).

Regressão do número de células em mg C/1. Dados obtidos a partir de suspensões concentradas de células cultivadas em sistema semicontínuo, ressuspensas em água destilada

Eixo das abcissas: mg C/l de algas concentradas utilizadas como alimento

Eixo das ordenadas: número de células/l de algas concentradas utilizadas como alimento

Coeficiente de correlação -0,926



Chlorella vulgaris var. *viridis* (CCAP 211/12).

Regressão da absorvância em mg C/l (células com 1 cm de comprimento). Dados obtidos a partir de suspensões concentradas de células cultivadas em sistema semicontínuo, ressuspensas em água destilada

Eixo das abcissas: mg C/l de algas concentradas utilizadas como alimento

Eixo das ordenadas: absorvância a 440 nm de uma diluição 1/10 de algas concentradas utilizadas como alimento

Coeficiente de correlação – 0,998

▼M7

Apêndice 4

EXEMPLO DE FOLHAS DE DADOS COM REGISTO DA RENOVAÇÃO DOS MEIOS, DADOS DE MONITORIZAÇÃO FÍSICA/QUÍMICA, ALIMENTAÇÃO, REPRODUÇÃO DE *DAPHNIA* E MORTALIDADE DE PROGENITORES

Experiência número:	Data do início:						Clone:			Meio:				Tipo de alimento				Produto químico em estudo:					Concentração nominal:	
Dia	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
Renovação do meio (assinalar os dias)																								
pH (*)																							novo	
																							antigo	
O_2 (mg/l) (*)																							novo	
																							antigo	
Temperatura (.°C) (*)																							novo	
																							antigo	
Alimentos fornecidos (assinalar os dias)																								
Número de descendentes vivos (**)																								Total
ReRecipiente 1																								
2																								
3																								
4																								
5																								

02008R0440 — PT — 16.10.2019 — 008.001 — 1825

▼M7

Experiência número:	Data do início:						Clone:			Meio:				Tipo de alimento				Produto químico em estudo:					Concentração nominal:	
Dia	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
6																								
7																								
8																								
9																								
10																								
																							Total	
Mortalidade cumulativa dos progenitores (***)																								

(*) Indicar recipiente utilizado na experiência.
(**) Registar ovos abortados como «AB» na casa correspondente
(***) Registar eventual mortalidade dos animais progenitores como «M» na casa correspondente

▼M7

Apêndice 5

EXEMPLO DE FOLHA DE DADOS PARA REGISTO DE RESULTADOS DA ANÁLISE QUÍMICA

a) **Concentrações medidas**

Conc. nominal	Amostra da semana 1		Amostra da semana 2		Amostra da semana 3	
	Nova	Antiga	Nova	Antiga	Nova	Antiga

b) **Concentrações medidas em percentagem do valor nominal**

Conc. nominal	Amostra da semana 1		Amostra da semana 2		Amostra da semana 3	
	Nova	Antiga	Nova	Antiga	Nova	Antiga

▼M7

Apêndice 6

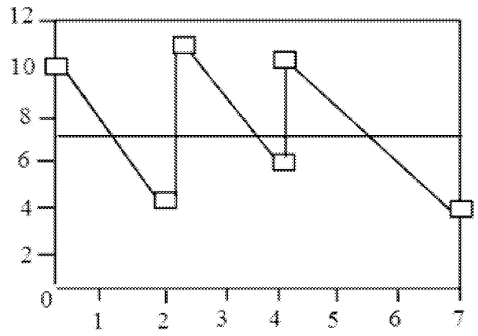
CÁLCULO DA MÉDIA PONDERADA EM FUNÇÃO DO TEMPO

Média ponderada em função do tempo

Considerando que a concentração do produto químico em estudo pode diminuir durante o período que decorre entre renovações do meio, é necessário determinar um valor de concentração representativo da gama de concentrações a que os progenitores *Daphnia* foram expostos. A determinação desse valor deve basear-se em considerações tanto biológicas como estatísticas. Por exemplo, se se considerar que a reprodução é afetada principalmente pela concentração máxima experimentada, deverá utilizar-se a concentração máxima. No entanto, se se considerar que o efeito acumulado ou a longo prazo da substância tóxica tem peso mais importante, será mais adequado utilizar um valor médio de concentração. Neste caso, o valor adequado será o da concentração média ponderada em função do tempo, uma vez que tem em conta a variação da concentração instantânea ao longo do tempo.

Figura 1

Exemplo de média ponderada em função do tempo



A figura 1 mostra um exemplo de ensaio (simplificado) com a duração de sete dias, em que o meio é renovado nos dias 0, 2 e 4.

— A linha em ziguezague representa a concentração ao longo do tempo. Assume-se que a queda da concentração segue uma curva exponencial.

— Os seis pontos expressos no gráfico representam as concentrações medidas no início e no fim de cada período de renovação.

— A linha mais espessa indica a posição da média ponderada em função do tempo.

A média ponderada em função do tempo é calculada de modo a que a área abaixo dessa linha seja igual à área abaixo da curva de concentração. O quadro 1 apresenta em pormenor o cálculo correspondente ao exemplo da figura 1.

Quadro 1

Cálculo da média ponderada em função do tempo

Renovação N.º	Dias	Conc 0	Conc 1	Ln(Conc 0)	Ln(Conc 1)	Área
1	2	10,000	4,493	2,303	1,503	13,767
2	2	11,000	6,037	2,398	1,798	16,544
3	3	10,000	4,066	2,303	1,403	19,781

▼M7

Renovação N.º	Dias	Conc 0	Conc 1	Ln(Conc 0)	Ln(Conc 1)	Área
Número total de dias:	7				Área total:	50,092
					Média ponderada em função do tempo:	7,156

A coluna *Dias* corresponde ao número de dias no período de renovação.

A coluna *Conc 0* corresponde à concentração medida no início de cada período de renovação.

A coluna *Conc 1* corresponde à concentração medida no final de cada período de renovação.

A coluna *Ln(Conc 0)* corresponde ao logaritmo natural de Conc 0.

A coluna *Ln(Conc 1)* corresponde ao logaritmo natural de Conc 1.

A coluna *Área* corresponde à área abaixo da curva exponencial para cada período de renovação. É calculada pela seguinte fórmula:

$$Área = \frac{Conc\ 0 - Conc\ 1}{Ln(Conc\ 0) - Ln(Conc\ 1)} \times Dia$$

A média ponderada em função do tempo (MPFT) é a *área total* dividida pelo *total de dias*.

Para o ensaio de reprodução de *Daphnia*, o quadro deve, logicamente, ser aumentado de modo a abranger 21 dias.

É óbvio que, quando as observações se limitam ao início e ao final de cada período de renovação, não é possível confirmar se o decaimento segue, de facto, uma curva exponencial. Uma curva diferente resultará num cálculo diferente para os valores da *área*. No entanto, o decaimento segundo uma curva exponencial constitui um modelo plausível que, na ausência de outras informações, constituirá provavelmente a curva mais adequada.

É, porém, necessário tomar algum cuidado no caso de a análise química não permitir detetar o produto químico no final do período de renovação. A menos que se possa estimar a velocidade a que o produto químico desapareceu da solução, é impossível obter uma área realista abaixo da curva e, consequentemente, uma média ponderada em função do tempo que seja razoável.

▼M7

Apêndice 7

ORIENTAÇÕES PARA A IDENTIFICAÇÃO DO SEXO DOS NEONATOS

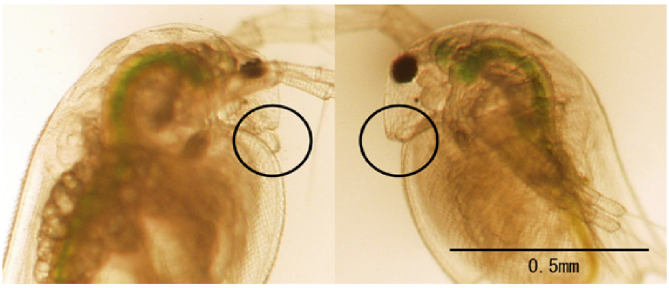
A produção de machos neonatos pode ocorrer em diferentes condições ambientais, tais como o encurtamento do período de irradiação, temperatura, concentração alimentar decrescente, e aumento da densidade populacional (Hobaek e Larson, 1990; Kleiven *et al*., 1992). A produção de machos constitui também uma resposta a certos reguladores do crescimento de insetos (Oda *et al*., 2005). Em condições nas quais fatores de stress químico induzam um decréscimo na produção de descendência das fêmeas partenogéneas, é de prever a ocorrência de um maior número de machos (OCDE, 2008). As informações disponíveis mostram não ser possível prever qual dos rácios entre sexos ou dos parâmetros de reprodução serão mais sensíveis; há, contudo, indícios (referência «relatório de validação», parte 1) de que o aumento do número de machos pode ser menos sensível do que a diminuição da descendência. Dado que o principal objetivo do método de ensaio consiste em avaliar o número de descendentes produzidos, a ocorrência de machos constitui uma observação opcional. Se este parâmetro facultativo for avaliado no contexto de um estudo, deve utilizar-se como critério adicional de validade do ensaio a ocorrência de não mais de 5 % de machos nos controlos.

A forma mais prática e fácil de diferenciar o sexo dos espécimes de *Daphnia* consiste em utilizar as suas características fenotípicas, pois os machos e as fêmeas são geneticamente idênticos, sendo o sexo determinado pelas condições ambientais. Machos e fêmeas diferem em termos de comprimento e morfologia das primeiras antenas, que são mais longas nos primeiros do que nas segundas (figura 1). Esta diferença é observável imediatamente após o nascimento, embora outras características sexuais secundárias evoluam à medida que os espécimes se desenvolvem (ver, p. ex., figura 2 em Olmstead e LeBlanc, 2000).

Para observar o sexo morfológico, os neonatos produzidos por cada animal de experimentação devem ser transferidos por recurso a uma pipeta e colocados numa placa de Petri com meio de ensaio. O meio é mantido a um nível mínimo, para restringir os movimentos dos animais. As primeiras antenas podem ser observadas por recurso a um microscópio estereoscópico (× 10-60).

Fig. 1

Macho (lado esquerdo) e fêmea (lado direito) de *D. magna* com 24 horas. Os machos podem ser distinguidos das fêmeas pelo comprimento e a morfologia das primeiras antenas, conforme indicado nos círculos (Tatarazako *et al*., 2004).



REFERÊNCIAS

Hobaek A and Larson P. 1990. Sex determination in *Daphnia magna*. Ecology 71: 2255-2268.

Kleiven O.T., Larsson P., Hobaek A. 1992. Sexual reproduction in *Daphnia magna* requires three stimuli. 65, 197-206.

Oda S., Tatarazako N, Watanabe H., Morita M., and Iguchi T. 2005. Production of male neonates in *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea) exposed to juvenile hormones and their analogs. 61:1168-1174.

▼**M7**

OCDE 2008. Validation report for an enhancement of OECD TG 211 *Daphnia magna* reproduction test. OECD Series on Testing and Assessment, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, France.

Olmstead, A.W., LeBlanc, G.A., 2000. Effects of endocrine-active chemicals on the development characteristics of *Daphnia magna*. Regulatory Toxicology and Pharmacology 19:2107-2113.

Tatarazako, N., Oda, S., Abe, R., Morita M. and Iguchi T., 2004. Development of a screening method for endocrine disruptors in crustaceans using *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea). Toxicological Sciences 17, 439-449.

▼B

C.21. MICROoRGANISMOS DO SOLO: ENSAIO DE TRANSFORMAÇÃO DE AZOTO

1. MÉTODO

O presente método de ensaio baseia-se na publicação OCDE TG 216 (1999).

1.1. INTRODUÇÃO

O presente método de ensaio descreve um método laboratorial concebido para a investigação dos efeitos, a longo prazo, resultantes de uma única exposição a produtos químicos, na capacidade de transformação do azoto pelos microorganismos do solo. O ensaio baseia-se, fundamentalmente, nas recomendações da Organização Europeia e Mediterrânica para a Protecção das Plantas (1), embora tenham sido igualmente consideradas outras linhas de orientação, nomeadamente as fornecidas pelas seguintes organizações: Biologische Bundesanstalt da Alemanha (2); Agência de Protecção do Ambiente dos EUA (3); SETAC (4) e Organização Internacional de Normalização (ISO) (5). As orientações respeitantes ao número e tipo de solos a utilizar neste ensaio são as acordadas na reunião de trabalho da OCDE sobre Selecção de Solos/Sedimentos que decorreu em Belgirate, Itália, em 1995 (6). As recomendações respeitantes à recolha, manuseamento e armazenamento de amostras de solos baseiam-se nas normas ISO 10381-6 (7) e nas recomendações da reunião de Belgirate. A determinação e avaliação das características de toxicidade de determinadas substâncias de ensaio poderão requerer a determinação dos seus efeitos sobre a actividade microbiana dos solos, por exemplo, quando se pretendem conhecer os potenciais efeitos secundários de produtos utilizados na protecção de culturas agrícolas sobre a microflora do solo ou quando se prevê a exposição dos microorganismos do solo a outro tipo de substâncias químicas. O ensaio de transformação de azoto aplica-se na determinação dos efeitos destes produtos sobre a microflora do solo. No ensaio de produtos químicos agrícolas (por exemplo, produtos de protecção de culturas, fertilizantes, químicos florestais) deverão realizar-se os ensaios de transformação de azoto e de transformação de carbono. Nos ensaios de produtos químicos não agrícolas, considera-se suficiente a realização do ensaio de transformação de azoto, ressalvando-se os casos em que os valores de CE_{50} obtidos no ensaio de transformação de azoto se encontrem dentro dos valores correspondentes aos inibidores de nitrificação comerciais (por exemplo, nitrapirina), casos em que deve ser efectuado um ensaio de transformação de carbono no sentido de se obter informação adicional.

Os solos são misturas complexas e heterogéneas de elementos vivos e não vivos. Os microorganismos desempenham um papel importante na decomposição e transformação da matéria orgânica em solos férteis através de processos complexos em que diversas espécies contribuem de forma distinta para cada um dos factores que determinam a fertilidade do solo. Por este motivo, qualquer interferência a longo prazo nos processos bioquímicos envolvidos constitui uma potencial interferência nos ciclos nutricionais, podendo vir a afectar a fertilidade do solo. A transformação de carbono e de azoto ocorre em todos os solos férteis e, ainda que as comunidades de microorganismos responsáveis por estes processos divirjam de solo para solo, as vias e processos de transformação são essencialmente os mesmos.

O Método de Ensaio aqui descrito foi desenvolvido com o objectivo de determinar os efeitos adversos a longo prazo de uma substância no processo de transformação de azoto em solos aeróbios de superfície. Este método de ensaio permite ainda estimar os efeitos dos produtos testados sobre a transformação de carbono pela microflora dos solos. Uma vez que a formação de nitratos ocorre subsequentemente à quebra das ligações azoto-carbono, a observação de taxas idênticas de produção de nitratos em solos tratados e de referência indica que é muito elevada a probabilidade de as principais etapas de degradação do carbono se encontrarem intactas e funcionais. O substrato escolhido para o ensaio (farinha de luzerna) possui uma relação carbono/azoto adequada (geralmente entre 12/1 e 16/1). Por este motivo, a privação de carbono é reduzida durante o ensaio e, no caso de as comunidades de microorganismos serem afectadas por um produto químico, será possível a sua recuperação num período de 100 dias.

▼B

Os ensaios que serviram de base ao presente Método de Ensaio foram inicialmente desenvolvidos para substâncias relativamente às quais é possível estimar a quantidade de substância que atinge o solo. É o caso, por exemplo, dos produtos utilizados para a protecção de culturas agrícolas, uma vez que é conhecida a sua taxa de aplicação nos campos. No caso de produtos químicos agrícolas, considera-se suficiente o ensaio de duas doses relevantes, relativamente à taxa de aplicação estimada ou prevista. Os produtos químicos agrícolas podem ser testados como ingredientes activos (i.a.) ou como formulações. A aplicação deste ensaio não se limita, no entanto, a produtos químicos agrícolas. Fazendo variar simultaneamente a quantidade de substância de ensaio aplicada no solo e o método de avaliação dos dados, o ensaio poderá ser igualmente utilizado em situações em que não é conhecida a quantidade de produto químico que atinge o solo Deste modo, para produtos químicos não agrícolas, deverão determinar-se os efeitos de uma série de concentrações sobre a transformação de azoto e utilizar-se os dados obtidos nesses ensaios para construir uma curva de dose-resposta, a partir da qual se calculam os valores de CE_x, em que x corresponde à percentagem de efeito.

1.2. DEFINIÇÕES

Transformação de azoto: é a degradação total por microorganismos de matéria orgânica contendo azoto, através do processo de amonificação e nitrificação, até ao respectivo nitrato inorgânico final.

EC_x (Concentração Efectiva): é a concentração da substância de ensaio no solo que resulta numa percentagem x de inibição da transformação de azoto em nitrato.

EC_{50} (Concentração Média Efectiva): é a concentração da substância de ensaio no solo que resulta em 50 % de inibição da transformação de azoto em nitrato.

1.3. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

Nenhuma.

1.4. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

Depois de peneirado, adiciona-se ao solo uma farinha de cereal, após o que se reserva uma parte que irá ser utilizada como controlo e se trata o restante com a substância de ensaio. No ensaio de produtos químicos agrícolas recomenda-se o teste de um mínimo de duas concentrações, que deverão ser escolhidas tendo em conta a maior concentração de substância que se prevê que venha a ser aplicada no campo. Após 0, 7, 14 e 28 dias de incubação, procede-se à extracção de amostras dos solos tratados e de controlo com um solvente adequado e determinam-se as quantidades de nitratos nos extractos. A taxa de formação de nitratos nas amostras tratadas é comparada com a taxa de formação de nitratos nas amostras de controlo e calcula-se a percentagem de desvio das amostras tratadas. Todos os ensaios têm uma duração mínima de 28 dias. Se ao 28.º dia as diferenças entre as amostras tratadas e as amostras não tratadas forem iguais ou superiores a 25 %, deverão continuar a efectuar-se medições até ao limite de 100 dias. Nos ensaios de produtos químicos não agrícolas, adiciona-se uma série de concentrações da substância de ensaio a amostras de solo, medindo-se as quantidades de nitratos formadas nas amostras tratadas e nas amostras de controlo após 28 dias de incubação. Os resultados dos ensaios com múltiplas concentrações são analisados através de um modelo de regressão, com base no qual se calculam os valores de CE_X (isto é: CE_{50}, CE_{25} ou CE_{10}). Ver definições.

1.5 VALIDADE DO ENSAIO

As análises dos resultados dos ensaios com produtos químicos agrícolas baseiam-se em diferenças relativamente pequenas (isto é, com um valor médio de ±25 %) entre as concentrações de nitrato nas amostras de solo tratadas e nas amostras de controlo. Por este motivo, e uma vez que grandes variações entre as amostras de controlo podem conduzir a resultados falsos, a variação entre repetições das amostras de controlo deve ser inferior a ±15 %.

▼B

1.6. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.6.1. **Equipamento**

Os recipientes utilizados durante o ensaio devem ser de materiais quimicamente inertes e ter uma capacidade adequada ao método usado na incubação dos solos, isto é, a granel ou numa série de amostras de solo individualizadas (ver secção 1.7.1.2). Devem tomar-se precauções no sentido de minimizar as perdas de água e permitir trocas gasosas durante o ensaio (por exemplo, os recipientes de ensaio podem ser cobertos com folhas de polietileno perfuradas). Para o ensaio de substâncias voláteis, devem ser usados recipientes seláveis e estanques com dimensões que permitam que aproximadamente um quarto do seu volume seja ocupado pela amostra de solo.

Utiliza-se, para além do equipamento corrente de laboratório, o seguinte equipamento:

— mecanismo de agitação: agitador mecânico ou equipamento equivalente,

— mecanismo de centrifugação (3 000 g) ou de filtração (uso de filtro que não contenha nitratos),

— instrumento de sensibilidade e reprodutibilidade adequadas para análise de nitratos.

1.6.2. **Selecção e número de solos**

No presente ensaio utiliza-se um único solo, cujas características recomendadas são as seguintes:

— teor de areia: não inferior a 50 % e não superior a 75 %,

— pH: 5,5 a 7,5,

— teor de carbono orgânico: 0,5 a 1,5 %,

— a biomassa microbiana deve ser medida (8)(9) e o seu teor de carbono deve corresponder, no mínimo, a 1 % do total de carbono orgânico do solo.

Na maioria dos casos, um solo com estas características representa a situação menos favorável, uma vez que nestas condições a adsorção da substância química de ensaio é mínima e a sua disponibilidade para a microflora é máxima. Por este motivo, a realização de ensaios com outros solos é geralmente desnecessária. Contudo, em determinadas circunstâncias, por exemplo, quando se prevê que a substância de ensaio venha a ser principalmente utilizada em solos específicos, tais como solos florestais acídicos, ou para produtos químicos com carga electrostática, poderá ser necessário utilizar um solo adicional.

▼B

1.6.3. **Recolha e armazenamento das amostras de solo**

1.6.3.1. *Recolha*

Deve existir, e estar disponível, informação pormenorizada sobre a história do local donde foram recolhidas, as amostras de solo para o ensaio. A informação necessária inclui a localização exacta, o coberto vegetal, as datas dos tratamentos com produtos utilizados para a protecção de culturas agrícolas, os tratamentos com fertilizantes orgânicos e inorgânicos, as aplicações de materiais biológicos e as de contaminações acidentais. Deverá ser escolhido, para a recolha de solo, um local que permita o seu uso a longo prazo. Consideram-se locais adequados: as pastagens permanentes, os campos com culturas anuais de cereais (à excepção de milho) ou os campos densamente semeados para produção de adubo natural. No local escolhido para a amostragem não devem ter sido aplicados produtos de protecção de culturas agrícolas, pelo menos, durante o último ano, nem nenhum fertilizante orgânico, pelo menos, nos últimos seis meses. O uso de fertilizantes minerais apenas poderá ser aceite quando em concordância com as necessidades das culturas agrícolas e, nesse caso, a recolha de amostras de solo não deverá ser efectuada antes de passados três meses após a aplicação do fertilizante. Deve ser evitado o uso de solos tratados com fertilizantes que tenham efeitos biocidas conhecidos (por exemplo, cianamida de cálcio).

Deve ser evitada a recolha de amostras durante, ou imediatamente após, períodos longos (superiores a 30 dias) de seca ou de excessos de água. Em solos lavrados, as amostras devem ser recolhidas a uma profundidade de 0 a 20 cm. Nas pastagens ou outros solos que não são lavrados durante períodos longos (pelo menos, uma época de cultivo), a profundidade máxima de amostragem pode ser ligeiramente superior a 20 cm (por exemplo, até 25 cm).

As amostras de solo devem ser transportadas em recipientes adequados, em condições de temperatura que garantam que as propriedades iniciais do solo não são alteradas de forma significativa.

1.6.3.2. *Armazenamento*

Sempre que possível, é de preferir a utilização de amostras de solos recolhidas na altura. Nos casos em que o armazenamento em laboratório não possa ser evitado, os solos devem ser armazenados no escuro, a uma temperatura de 4 ± 2 °C e por um período máximo de três meses. Durante o armazenamento dos solos, devem ser asseguradas condições aeróbias. Se os solos forem recolhidos em zonas onde permanecem gelados por períodos iguais ou superiores a três meses por ano, poderá ser considerada a hipótese do seu armazenamento durante seis meses a uma temperatura entre 18 °C negativos e 22 °C negativos. A biomassa microbiana de solos armazenados é medida antes de cada experiência e o teor de carbono na biomassa não deverá ser inferior a 1 % do teor total de carbono orgânico no solo (ver secção 1.6.2).

1.6.4. **Manuseamento e preparação do solo para o ensaio**

1.6.4.1. *Pré-incubação*

Se o solo esteve armazenado (ver secção 1.6.3.2), recomenda-se um período de pré-incubação de 2 a 28 dias. A temperatura e a humidade do solo durante a pré-incubação e o ensaio devem ser idênticas às utilizadas durante o ensaio (ver secções 1.6.4.2 e 1.7.1.3).

▼B

1.6.4.2. *Características físico-químicas*

Os objectos de grandes dimensões (por exemplo, pedras, pedaços de plantas, etc.) são removidos manualmente do solo e a amostra é peneirada húmida, evitando dessecação excessiva, de forma a reduzir as partículas a uma dimensão máxima de 2 mm. O teor de humidade da amostra de solo deve ser ajustado com água destilada ou desionizada para um valor entre 40 % e 60 % da sua capacidade máxima de retenção de água.

1.6.4.3. *Adição de substrato orgânico*

Deverá ser adicionado ao solo um substrato orgânico adequado — por exemplo, farinha de luzerna-erva-relva (componente principal: *Medicago sativa)* com uma relação C/N entre 12/1 e 16/1. A relação luzerna-solo recomendada é de 5 g de luzerna por quilograma de solo (peso seco).

1.6.5. **Preparação da substância de ensaio para aplicação no solo**

A aplicação da substância de ensaio no solo envolve, geralmente, a utilização de um excipiente (matriz de transporte), que pode ser água (para substâncias hidrossolúveis) ou um sólido inerte, como, por exemplo, areia fina de quartzo (tamanho de partículas: 0,1 a 0,5 mm). A utilização de outros excipientes líquidos (por exemplo, solventes orgânicos, como acetona, clorofórmio) deve ser evitada devido à possibilidade de virem a afectar a microflora. Nos casos em que se use areia como excipiente, esta pode ser coberta com a substância de ensaio em solução ou suspensão num solvente adequado. Nesses casos, o solvente deve ser removido por evaporação antes da mistura com o solo. De modo a optimizar a distribuição da substância de ensaio no solo, recomenda-se uma relação de 10 g de areia por quilograma de solo (peso seco). As amostras de controlo são tratadas com uma quantidade equivalente de água ou de areia de quartzo (sem adição de substância de ensaio).

Nos ensaios de produtos químicos voláteis importa, tanto quanto possível, evitar perdas durante o tratamento e procurar assegurar a homogeneidade da distribuição dos produtos no solo (por exemplo, as substâncias de ensaio devem ser injectadas em diferentes locais do solo).

1.6.6. **Concentrações de ensaio**

Nos ensaios de produtos químicos agrícolas devem ser usadas pelo menos duas concentrações. A concentração inferior deve reflectir, no mínimo, a quantidade máxima que se espera que, na prática, venha a atingir o solo, enquanto a concentração mais elevada deve ser um múltiplo da concentração inferior. As concentrações da substância de ensaio adicionada ao solo são calculadas assumindo uma incorporação uniforme até uma profundidade de 5 cm e uma densidade aparente do solo de 1,5. Para produtos químicos agrícolas que são aplicados directamente no solo ou para compostos químicos cuja quantidade que atinge o solo pode ser prevista, as concentrações recomendadas são a máxima concentração prevista no ambiente («predicted environmental concentration», PEC) e cinco vezes o valor dessa concentração. Nos casos em que se prevê que as substâncias sejam aplicadas diversas vezes no solo durante uma mesma estação, devem ser efectuados ensaios a concentrações correspondentes à multiplicação da PEC pelo número máximo de aplicações previsto. Contudo, a concentração máxima de ensaio não deve exceder dez vezes a taxa máxima para uma única aplicação. Nos ensaios de produtos químicos não agrícolas. deve ser usada uma série geométrica de, pelo menos, cinco concentrações. As concentrações usadas devem cobrir a gama necessária para os cálculos dos valores de CE_x.

▼B

1.7. PROCEDIMENTO DO ENSAIO

1.7.1. **Condições de Exposição**

1.7.1.1. *Tratamento e Controlo*

Nos ensaios de produtos químicos agrícolas, o solo é dividido em três porções de igual peso. Duas porções são misturadas com o excipiente contendo o produto e a terceira é misturada apenas com o excipiente (amostra de controlo). Recomenda-se um mínimo de três repetições para ambos os solos, tratado e de controlo. Nos ensaios de produtos químicos não agrícolas, o solo é dividido em seis porções de igual peso. Cinco das amostras são misturadas com o excipiente contendo o produto e a sexta é misturada com o excipiente não activado. Recomendam-se três repetições para ambos os solos, tratado e de controlo. Devem ser tomadas precauções de modo a assegurar uma distribuição homogénea da substância de ensaio nas amostras de solo tratadas. Durante a mistura deve evitar-se a aglomeração ou compactação do solo.

1.7.1.2. *Incubação das amostras de solo*

A incubação das amostras de solo pode ser realizada de duas formas: usando cada um dos solos, tratado e de controlo, como amostras únicas ou dividindo-os numa série de subamostras individualizadas e de igual peso. Contudo, no caso de substâncias voláteis, os ensaios devem ser realizados obrigatoriamente na forma de séries de subamostras individuais. Quando os solos são incubados como amostras únicas, preparam-se grandes quantidades de cada solo, tratado e de controlo, e vão-se retirando subamostras para análise, conforme necessário, ao longo do ensaio. A quantidade de solo inicialmente preparada para cada tratamento e para cada controlo depende do tamanho das subamostras a retirar durante o ensaio, do número de repetições a realizar e do número máximo de tempos de amostragem previsto. Os solos incubados como amostras únicas devem ser misturados vigorosamente antes de cada subamostragem. Quando os solos são incubados como uma série de amostras individualizadas, cada solo tratado e de controlo é inicialmente dividido no número de subamostras pretendido e estas utilizadas conforme necessário. Nas experiências em que se prevêem mais de dois tempos de amostragem, devem preparar-se subamostras em número suficiente para todas as repetições de todas as amostragens. Pelo menos, três repetições do solo de ensaio devem ser incubadas em condições aeróbias (ver secção 1.7.1.1). Os recipientes utilizados durante todos os testes devem possuir um volume livre suficiente para impedir o desenvolvimento de condições anaeróbias. Nos casos em que as substâncias de ensaio são voláteis, o ensaio só deve ser realizado com séries de subamostras individualizadas.

1.7.1.3. *Condições e duração dos ensaios*

O ensaio é realizado em câmara escura à temperatura de 20±2°C. Durante o ensaio, o teor de humidade das amostras de solo deve. ser mantido entre 40 % e 60 % da capacidade máxima de retenção de água do solo (ver secção 1.6.4.2), com uma variação máxima de ±5 %. Sempre que necessário, pode adicionar-se água destilada ou desionizada.

A duração mínima do ensaio é de 28 dias. Nos ensaios de produtos químicos agrícolas, comparam-se as taxas de formação de nitratos nas amostras tratadas e de controlo. Se estes valores diferirem em mais de 25 % após o 28.º dia, o ensaio continua até que essa diferença atinja um valor igual ou inferior a 25 % ou até ao 100.º dia. Para compostos químicos não agrícolas, o ensaio tem a duração de 28 dias. No 28.º dia, determinam-se as quantidades de nitratos nas amostras de solo tratadas e de controlo e calculam-se os valores de CE_x.

▼B

1.7.2. **Amostragem e análise dos solos**

1.7.2.1. *Calendário de amostragem dos solos*

Nos ensaios de produtos químicos agrícolas, analisa-se a quantidade de nitratos nas amostras de solo nos dias 0, 7, 14 e 28. Caso seja necessário prolongar o ensaio, após o 28.º dia devem efectuar-se medições com intervalos de 14 dias.

Nos ensaios de produtos químicos não agrícolas, testa-se um mínimo de cinco concentrações de ensaio e a análise de nitratos nas amostras de solo efectua-se no início (dia 0) e no fim do período de exposição (28.º dia). Nos casos em que tal se revele necessário, podem realizar-se medições intermédias — por exemplo, ao 7.° dia. Os dados obtidos ao 28.° dia são utilizados para determinar o valor de CE_X para o produto químico. Se desejado, os dados obtidos para a amostra de controlo no dia 0 podem ser utilizados para indicar a quantidade inicial de nitratos no solo.

1.7.2.2. *Análise das amostras de solo*

Para cada repetição de cada amostra de solo, tratada e de controlo, determina-se a quantidade de nitratos formada em cada tempo de amostragem. Os nitratos são removidos do solo por agitação das amostras num solvente de extracção adequado — por exemplo, uma solução 0,1 M de cloreto de potássio. Recomenda-se uma razão de 5 ml de solução de KCl por equivalente de grama de solo (peso seco). Para optimizar a extracção, a mistura da amostra de solo com a solução de extracção não deve ocupar mais de metade do volume do recipiente de extracção. As misturas são agitadas a 150 rpm durante 60 minutos e em seguida centrifugadas ou filtradas, sendo a fase líquida resultante analisada para detecção de nitratos. Os extractos líquidos livres de partículas sólidas podem ser armazenados antes de analisados, devendo ser mantidos a 20±5ºC negativos até um máximo de seis meses.

2. **DADOS**

2.1. TRATAMENTO DE RESULTADOS

Nos ensaios efectuados com produtos químicos agrícolas, regista-se a quantidade de nitratos formada em cada repetição de cada amostra de solo e os valores médios do conjunto de repetições devem ser apresentados numa tabela. As taxas de transformação de azoto devem ser analisadas usando métodos estatísticos usuais e adequados (por exemplo, Teste-F, nível de significância de 5 %). As quantidades de nitratos formados expressam-se em mg nitrato/kg solo (peso seco)/dia. A taxa de formação de nitratos em cada tratamento é comparada com a da respectiva amostra de controlo, calculando-se o desvio, em percentagem, da amostra de teste relativamente ao controlo.

Nos ensaios efectuados com produtos químicos não agrícolas, determina-se a quantidade de nitratos formados em cada repetição e traça-se uma curva de dose-resposta para estimar os valores de CE_x. As quantidades de nitratos — isto é, mg nitrato/kg solo (peso seco) — obtidas para as amostras tratadas, após 28 dias são comparadas com as quantidades obtidas para as amostras de controlo. A partir destes resultados, calcula-se a percentagem de inibição para cada concentração de ensaio. As percentagens obtidas são representadas num gráfico em função da concentração e, usando procedimentos estatísticos, determinam-se os valores de CE_X. Os limites de confiança ($p = 0,95$) para os valores de CE_x calculados são igualmente determinados usando métodos-padrão (10) (11) (12).

No caso de conterem quantidades elevadas de azoto, as substâncias de ensaio podem contribuir para as quantidades de nitratos formadas durante o ensaio. Por este motivo, em ensaios com elevadas concentrações dessas substâncias (por exemplo, compostos químicos que se prevê que venham a ser usados em aplicações repetidas), devem ser incluídas amostras de controlo adequadas (isto é, uma mistura de solo com a substância de ensaio, sem a farinha vegetal). Os dados dessas amostras de controlo devem ser tidos era conta nos cálculos de CE_x.

▼B

2.2. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Quando, na avaliação dos resultados dos ensaios com produtos químicos agrícolas, a diferença entre as taxas de formação de nitratos entre o tratamento com a menor concentração (isto é, correspondente à máxima concentração prevista para a situação real) e a respectiva amostra de controlo for igual ou inferior a 25 % em qualquer amostragem efectuada após o 28.° dia, o produto pode ser considerado como não tendo influência a longo prazo na transformação de azoto dos solos. Para ensaios envolvendo produtos químicos não agrícolas, os valores CE50, CE_{25} ou CE_{10} são utilizados como indicadores.

3. **RELATÓRIO**

O relatório do ensaio deve incluir a seguinte informação:

Identificação completa do solo utilizado, incluindo:

— referência geográfica do local (latitude, longitude),

— informação sobre a caracterização histórica do local (isto é, coberto vegetal, tratamentos com produtos de protecção das culturas agrícolas, tratamentos com fertilizantes, contaminações acidentais, etc.),

— uso do solo (por exemplo, solo agrícola, floresta, etc.),

— profundidade de amostragem (cm),

— teor de areia/lama/argila (% peso seco),

— pH (em água),

— teor de carbono orgânico (% peso seco),

— teor de azoto (% peso seco),

— concentração inicial de nitratos (mg nitratos/kg peso seco),

— capacidade de permuta catiónica (mmol/kg),

— biomassa microbiana, em termos de percentagem de carbono orgânico total,

— referência dos métodos usados na determinação de cada parâmetro,

— toda a informação relacionada com a recolha e armazenamento das amostras de solo,

— pormenores sobre a pré-incubação do solo, quando existir.

Substância de ensaio:

— natureza física e, quando relevante, propriedades físico-químicas,

— dados de identificação química, sempre que relevantes, incluindo fórmula estrutural, pureza (teor do componente activo, em percentagem, no caso dos produtos de protecção das culturas agrícolas), teor de azoto.

Substrato:

— origem do substrato,

— composição (isto é, farinha de luzerna, farinha de luzerna-erva-relva),

— teor de carbono e azoto (% peso seco),

— diâmetro dos peneiras (mm).

▼B

Condições de ensaio:

— pormenores sobre a adição de substrato orgânico ao solo,

— número de concentrações do produto químico de ensaio que foram testadas e, quando adequado, justificação das concentrações de ensaio escolhidas,

— pormenores sobre a aplicação da substância de ensaio no solo,

— temperatura de incubação,

— teor de humidade do solo no início e durante o ensaio,

— método usado na incubação do solo (isto é, como amostra única ou como séries de subamostras individualizadas),

— número de repetições,

— tempos de amostragem,

— método usado para extracção de nitratos do solo;

Resultados:

— procedimento analítico e equipamento usado na análise de nitratos,

— tabelas de resultados, incluindo valores individuais e valores médios para as medições de nitratos,

— variação entre repetições nas amostras tratadas e nas amostras de controlo,

— explicação das correcções efectuadas nos cálculos, quando relevantes,

— a variação percentual da taxa de formação de nitratos em cada ponto de amostragem ou, quando adequado, o valor de CE_{50} com um limite de confiança de 95 %, outros valores de CE_x (isto é, CE_{25} ou CE_{10}), com os respectivos intervalos de confiança, e a representação gráfica da curva de dose-resposta,

— tratamento estatístico dos resultados,

— toda a informação e observações úteis para a interpretação dos resultados.

4. **REFERÊNCIAS**

(1) EPPO (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Capítulo 7: Soil Microflora. EPPO Bulletin 24: 1-16, 1994.

(2) BBA (1990). Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1-1 (2.ª edição, 1990).

(3) EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. 28 de Setembro de 1987.

(4) SETAC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M. R. Lynch, Pub. SETAC-Europa, Bruxelas.

(5) ISO/DIS 14238 (1995). Soil Quality — Determination of Nitrogen Mineralisation and Nitrification in Soils and the Influence of Chemicals on these Processes. Comité Técnico ISO/TC 190/SC 4: *Soil Quality — Biological Methods.*

▼B

(6) OCDE (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Itália, 18-20 de Janeiro de 1995.

(7) ISO 10381-6 (1993). Soil quality — Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(8) ISO 14240-1 (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 1: Substrate-induced respiration method.

(9) ISO 14240-2 (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 2: Fumigation-extraction method.

(10) Litchfield, J. T. e Wilcoxon F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 99-113.

(11) Finney, D. J. (1971). Probit Analysis. 3.ª edição, Cambridge, Londres e Nova Iorque.

(12) Finney, D. J. (1978). Statistical Methods in Biological Assay. Griffin, Weycombe, Reino Unido.

▼B

C.22. MICROORGANISMOS DO SOLO: ENSAIO DE TRANSFORMAÇÃO DE CARBONO

1. MÉTODO

O presente método de ensaio baseia-se na publicação OCDE TG 217 (1999).

1.1. INTRODUÇÃO

O presente método de ensaio descreve um método laboratorial concebido para a investigação dos potenciais efeitos, a longo prazo, resultantes de uma única exposição a produtos de protecção de culturas agrícolas, e possivelmente outras substâncias químicas, na capacidade de transformação do carbono pelos microorganismos do solo. O ensaio baseia-se, fundamentalmente, nas recomendações da Organização Europeia e Mediterrânica para a Protecção das Plantas (1), embora tenham sido igualmente consideradas outras linhas de orientação, nomeadamente as fornecidas pelas seguintes organizações: Biologische Bundesanstalt da Alemanha (2); Agência de Protecção do Ambiente dos EUA (3) e SETAC (4). As orientações respeitantes ao número e tipo de solos a utilizar neste ensaio são as acordadas na reunião de trabalho da OCDE sobre Selecção de Solos/Sedimentos que decorreu em Belgirate, Itália, em 1995 (5). As recomendações respeitantes à recolha, manuseamento e armazenamento de amostras de solos baseiam-se nas normas ISO 10381-6 (6) e nas recomendações da reunião de Belgirate.

A determinação e avaliação das características de toxicidade de determinadas substâncias de ensaio poderão requerer a determinação dos seus efeitos sobre a actividade microbiana dos solos, por exemplo, quando se pretende conhecer os potenciais efeitos secundários de produtos utilizados na protecção de culturas agrícolas sobre a microflora do solo ou quando se prevê a exposição dos microorganismos do solo a outro tipo de substâncias químicas. O ensaio de transformação de carbono aplica-se na determinação dos efeitos destes produtos sobre a microflora do solo. No ensaio de produtos químicos agrícolas (por exemplo, produtos de protecção de culturas, fertilizantes, químicos florestais) devem realizar-se os ensaios de transformação de carbono e de transformação de azoto. Nos ensaios de produtos químicos não agrícolas, considera-se suficiente a realização do ensaio de transformação de azoto, ressalvando-se os casos em que os valores de CE_{50} obtidos no ensaio de transformação de azoto se encontrem dentro dos valores correspondentes aos inibidores de nitrificação comerciais (por exemplo, nitrapirina), casos em que deve ser efectuado um ensaio de transformação de carbono no sentido de se obter informação adicional.

Os solos são misturas complexas e heterogéneas de elementos vivos e não vivos. Os microorganismos desempenham um papel importante na decomposição e transformação da matéria orgânica em solos férteis através de processos complexos em que diversas espécies contribuem de forma distinta para cada um dos factores que determinam a fertilidade do solo. Por este motivo, qualquer interferência a longo prazo nos processos bioquímicos envolvidos constitui uma potencial interferência nos ciclos nutricionais, podendo vir a afectar a fertilidade do solo. A transformação de carbono e de azoto ocorre em todos os solos férteis e, ainda que as comunidades de microorganismos responsáveis por estes processos divirjam de solo para solo, as vias e processos de transformação são essencialmente os mesmos.

▼B

O Método de Ensaio aqui descrito foi desenvolvido com o objectivo de determinar os efeitos adversos a longo prazo de uma substância, no processo de transformação de carbono em solos aeróbios de superfície. O ensaio é sensível a alterações na dimensão e actividade das comunidades microbianas responsáveis pela transformação do carbono, na medida em que sujeita essas comunidades simultaneamente a condições de stress químico e de privação de carbono. Utiliza-se um solo arenoso pobre em matéria orgânica. O solo é tratado com a substância de ensaio e incubado em condições tais que permitem um rápido metabolismo microbiano, e sob as quais as fontes de carbono acessíveis no solo se esgotam rapidamente. O processo provoca o empobrecimento de carbono, causando simultaneamente a morte das células microbianas e a indução do estado de letargia ou esporulação. Se o teste decorrer durante um período superior a 28 dias, o somatório destas reacções pode ser medido em amostras de controlo (solo não tratado) como uma perda progressiva da biomassa microbiana metabolicamente activa (7). Se a biomassa de um solo em stress por privação de carbono, nas condições de ensaio, é afectada pela presença de um produto químico, a recuperação do solo poderá não se verificar até ao mesmo nível que o solo de controlo. Por este motivo, as perturbações causadas pela substância de ensaio, em qualquer momento do ensaio, mantêm-se geralmente até ao final do mesmo.

Os ensaios que serviram de base ao presente Método de Ensaio foram inicialmente desenvolvidos para substâncias relativamente às quais é possível estimar a quantidade de substância que atinge o solo. É o caso, por exemplo, dos produtos utilizados para a protecção de culturas agrícolas, uma vez que é conhecida a sua taxa de aplicação nos campos. No caso de produtos químicos agrícolas, considera-se suficiente o ensaio de duas doses relevantes, relativamente à taxa de aplicação estimada ou prevista. Os produtos químicos agrícolas podem ser testados como ingredientes activos (i.a.) ou como formulações. A aplicação deste ensaio não se limita, no entanto, a produtos químicos agrícolas. Fazendo variar simultaneamente a quantidade de substância de ensaio aplicada no solo e o método de avaliação dos dados, o ensaio poderá ser igualmente utilizado em situações em que não é conhecida a quantidade de produto químico que atinge o solo. Deste modo, para produtos químicos não agrícolas, deverão determinar-se os efeitos de uma série de concentrações sobre a transformação de carbono e utilizar-se os dados obtidos nesses ensaios para construir uma curva de dose-resposta, a partir da qual se calculam os valores de CE_x, em que x corresponde à percentagem de efeito.

1.2. DEFINIÇÕES

Transformação de carbono: é a degradação da matéria orgânica por microorganismos até formar um produto final inorgânico, o dióxido de carbono.

EC_x (Concentração Efectiva): é a concentração da substância de ensaio no solo que resulta numa percentagem x de inibição da transformação de carbono em dióxido de carbono.

EC_{50} (Concentração Média Efectiva): é a concentração da substância de ensaio no solo que resulta em 50 % de inibição da transformação de carbono em dióxido de carbono.

1.3. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

Nenhuma.

▼B

1.4. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

O solo peneirado é tratado com a substância de ensaio ou deixado por tratar (controlo). No ensaio de produtos químicos agrícolas recomenda-se o teste de um mínimo de duas concentrações, que deverão ser escolhidas tendo em conta a maior concentração de substância que se prevê que venha a ser aplicada no campo. Após 0, 7, 14 e 28 dias de incubação, amostras do solo tratadas e de controlo são misturadas com glucose e a taxa de respiração induzida pela glucose é medida durante 12 horas consecutivas. As taxas de respiração são expressas em termos de dióxido de carbono libertado (mg dióxido de carbono/kg solo seco/h) ou de oxigénio consumido (mg oxigénio/kg solo/h). A taxa média de respiração nas amostras tratadas é comparada com a das respectivas amostras de controlo e calcula-se a percentagem de desvio das amostras tratadas relativamente às de controlo. Todos os ensaios têm uma duração mínima de 28 dias. Se ao 28.º dia as diferenças entre as amostras tratadas e as amostras não tratadas forem iguais ou superiores a 25 %, devem continuar a efectuar-se medições, em intervalos de 14 dias, até ao limite de 100 dias. Nos ensaios de produtos químicos não agrícolas, adiciona-se uma série de concentrações da substância de ensaio a amostras de solo e medem-se as taxas de respiração induzida por glucose (isto é, a média das quantidades de dióxido de carbono formado ou de oxigénio consumido) após 28 dias. Os resultados dos ensaios com múltiplas concentrações são analisados através de um modelo de regressão, com base no qual se calculam os valores de CE_x (isto é: CE_{50}, CE_{25} ou CE_{10}). Ver definições.

1.5. VALIDADE DO ENSAIO

As análises dos resultados dos ensaios com produtos químicos agrícolas baseiam-se em diferenças relativamente pequenas (isto é, com um valor médio de ± 25 %) entre as quantidades de dióxido de carbono libertado ou de oxigénio consumido nas (ou pelas) amostras de solo tratadas e nas (ou pelas) amostras de controlo. Por este motivo, e uma vez que grandes variações entre as amostras de controlo podem conduzir a resultados falsos, a variação entre repetições das amostras de controlo deve ser inferior a ± 15 %.

1.6. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.6.1. **Equipamento**

Os recipientes utilizados durante o ensaio devem ser de materiais quimicamente inertes e ter uma capacidade adequada ao método usado na incubação dos solos, isto é, a granel ou numa série de amostras de solo individualizadas (ver secção 1.7.1.2). Devem tomar-se precauções no sentido de minimizar as perdas de água e permitir trocas gasosas durante o ensaio (por exemplo, os recipientes de ensaio podem ser cobertos com folhas de polietileno perfuradas). Para o ensaio de substâncias voláteis, devem ser usados recipientes seláveis e estanques com dimensões que permitam que aproximadamente um quarto do seu volume seja ocupado pela amostra de solo.

Para a determinação da taxa de respiração induzida pela glucose, são necessários sistemas de incubação e instrumentos para medir a produção de dióxido de carbono ou o consumo de oxigénio. Na literatura encontram-se exemplos destes sistemas e instrumentos (8) (9) (10) (11).

1.6.2. **Selecção e número de solos**

No presente ensaio utiliza-se um único solo, cujas características recomendadas são as seguintes:

— teor de areia: não inferior a 50 % e não superior a 75 %;

▼B

— pH: 5,5 a 7,5;

— teor de carbono orgânico: 0,5 a 1,5 %;

— a biomassa microbiana deve ser medida (12)(13) e o seu teor de carbono deve corresponder, no mínimo, a 1 % do carbono orgânico total do solo.

Na maioria dos casos, um solo com estas características representa a situação menos favorável, uma vez que nestas condições a adsorção da substância química de ensaio é mínima e a sua disponibilidade para a microflora é máxima. Por este motivo, a realização de ensaios com outros solos é geralmente desnecessária. Contudo, em determinadas circunstâncias, por exemplo, quando se prevê que a substância de ensaio venha a ser principalmente utilizada em solos específicos, tais como solos florestais acídicos, ou para produtos químicos com carga electrostática, poderá ser necessário utilizar um outro tipo de solo.

1.6.3. **Recolha e armazenamento das amostras de solo**

1.6.3.1. *Recolha*

Deve existir, e estar disponível, informação pormenorizada sobre a história do local donde foram recolhidas as amostras de solo para o ensaio. A informação necessária inclui a localização exacta, o coberto vegetal, as datas dos tratamentos com produtos utilizados para a protecção de culturas agrícolas, dos tratamentos com fertilizantes orgânicos e inorgânicos, das aplicações de materiais biológicos ou de contaminações acidentais. Deverá ser escolhido, para a recolha de solo, um local que permita o seu uso a longo prazo. Consideram-se locais adequados: as pastagens permanentes, os campos com culturas anuais de cereais (à excepção de milho) ou os campos densamente semeados para produção de adubo verde. No local escolhido para a amostragem não devem ter sido aplicados produtos de protecção de culturas agrícolas, pelo menos, durante o último ano, nem nenhum fertilizante orgânico, pelo menos, nos últimos seis meses. O uso de fertilizantes minerais apenas poderá ser aceite quando em concordância com as necessidades das culturas agrícolas e, nesse caso, a recolha de amostras de solo não deverá ser efectuada antes de passados três meses após a aplicação do fertilizante. Deve ser evitado o uso de solos tratados com fertilizantes que tenham efeitos biocidas conhecidos (por exemplo, cianamida de cálcio).

Deve ser evitada a recolha de amostras durante, ou imediatamente após, períodos longos (superiores a 30 dias) de seca ou de exploração de águas. Em solos lavrados, as amostras devem ser recolhidas a uma profundidade de 0 a 20 cm. Nas pastagens ou outros solos que não são lavrados durante períodos longos (pelo menos, uma época de cultivo), a profundidade máxima de amostragem pode ser ligeiramente superior a 20 cm (por exemplo, até 25 cm). As amostras de solo devem ser transportadas em recipientes adequados e em condições de temperatura que garantam que as propriedades iniciais do solo não são alteradas de forma significativa.

1.6.3.2. *Armazenamento*

Sempre que possível, é preferível a utilização de amostras de solos recolhidas na altura. Nos casos em que o armazenamento em laboratório não possa ser evitado, os solos devem ser armazenados no escuro, a uma temperatura de 4±2°C e por um período máximo de três meses. Durante o armazenamento dos solos, devem ser asseguradas condições aeróbias. Se os solos forem recolhidos em zonas onde permanecem gelados por períodos iguais ou superiores a três meses por ano, poderá ser considerada a hipótese do seu armazenamento durante seis meses a uma temperatura de 18°C negativos. A biomassa microbiana de solos armazenados é medida antes de cada experiência e o teor de carbono na biomassa não deverá ser inferior a 1 % do teor total de carbono orgânico no solo (ver secção 1.6.2).

▼B

1.6.4. **Manuseamento e preparação do solo para o ensaio**

1.6.4.1. *Pré-incubação*

Se o solo esteve armazenado (ver secção 1.6.3.2), recomenda-se um período de pré-incubação de 2 a 28 dias. A temperatura e a humidade do solo durante a pré-incubação e o ensaio devem ser idênticas às utilizadas durante o ensaio (ver secções 1.6.4.2 e 1.7.1.3).

1.6.4.2. *Características físico-químicas*

Os objectos de grandes dimensões (por exemplo, pedras, pedaços de plantas, etc.) são removidos manualmente do solo e a amostra é peneirada húmida, evitando a dessecação excessiva, de forma a reduzir as partículas a uma dimensão máxima de 2 mm. O teor de humidade da amostra de solo deve ser ajustado com água destilada ou desionizada para um valor entre 40 % e 60 % da sua capacidade máxima de retenção de água.

1.6.5. **Preparação da substância de ensaio para aplicação no solo**

A aplicação da substância de ensaio no solo envolve, geralmente, a utilização de um excipiente (matriz de transporte), que pode ser água (para substâncias hidrossolúveis) ou um sólido inerte, como, por exemplo, areia fina de quartzo (tamanho de partículas: 0,1 a 0,5 mm). A utilização de outros excipientes líquidos (por exemplo, solventes orgânicos, como acetona, clorofórmio) deve ser evitada devido à possibilidade de virem a afectar a microflora. Nos casos em que se use areia como excipiente, esta pode ser coberta com a substância de ensaio em solução ou suspensão num solvente adequado. Nesses casos, o solvente deve ser removido por evaporação antes da mistura com o solo. De modo a optimizar a distribuição da substância de ensaio no solo, recomenda-se uma relação de 10 g de areia por quilograma de solo (peso seco). As amostras de controlo são tratadas com uma quantidade equivalente de água ou de areia de quartzo (sem adição de substância de ensaio).

Nos ensaios de produtos químicos voláteis importa, tanto quanto possível, evitar perdas durante o tratamento e procurar assegurar a homogeneidade da distribuição dos produtos no solo (por exemplo, as substâncias de ensaio devem ser injectadas em diferentes locais do solo).

1.6.6. **Concentrações de ensaio**

Nos ensaios de produtos utilizados para protecção de culturas agrícolas, ou outros produtos químicos cujas concentrações ambientais possam ser previstas, devem ser usadas, pelo menos, duas concentrações. A concentração inferior deve reflectir, no mínimo, a quantidade máxima que se espera que, na prática, venha a atingir o solo, enquanto a concentração mais elevada deve ser um múltiplo da concentração inferior. As concentrações da substância de ensaio adicionada ao solo são calculadas assumindo uma incorporação uniforme até uma profundidade de 5 cm e uma densidade aparente do solo de 1,5. Para produtos químicos agrícolas que são aplicados directamente no solo ou para compostos químicos cuja quantidade que atinge o solo pode ser prevista, as concentrações recomendadas são a máxima concentração prevista no ambiente («predicted environmental concentration», PEC) e cinco vezes o valor dessa concentração. Nos casos em que se prevê que as substâncias sejam aplicadas diversas vezes no solo durante uma mesma estação, devem ser efectuados ensaios a concentrações correspondentes à multiplicação da PEC pelo número máximo de aplicações previsto. Contudo, a concentração máxima de ensaio não deve exceder dez vezes a taxa máxima para uma única aplicação.

Nos ensaios de produtos químicos não agrícolas deve ser usada uma série geométrica de, pelo menos, cinco concentrações. As concentrações usadas devem cobrir a gama necessária para os cálculos dos valores de CE_x.

▼B

1.7. PROCEDIMENTO DO ENSAIO

1.7.1. **Condições de Exposição**

1.7.1.1. *Tratamento e Controlo*

Nos ensaios de produtos químicos agrícolas, o solo é dividido em três porções de igual peso. Duas porções são misturadas com o excipiente contendo o produto e a terceira é misturada apenas com o excipiente (amostra de controlo). Recomenda-se um mínimo de três repetições para ambos os solos, tratado e de controlo. Nos ensaios de produtos químicos não agrícolas, o solo é dividido em seis porções de igual peso. Cinco das amostras são misturadas com o excipiente contendo o produto e a sexta é misturada com o excipiente não activado. Recomendam-se três repetições para ambos os solos, tratado e de controlo. Devem ser tomadas precauções de modo a assegurar uma distribuição homogénea da substância de ensaio nas amostras de solo tratadas. Durante a mistura deve evitar-se a aglomeração ou compactação do solo.

1.7.1.2. *Incubação das amostras de solo*

A incubação das amostras de solo pode ser realizada de duas formas: usando cada um dos solos, tratado e de controlo, como amostras únicas, ou dividindo-os numa série de subamostras individualizadas e de igual peso. Contudo, no caso de substâncias voláteis, os ensaios devem ser realizados obrigatoriamente na forma de séries de subamostras individuais. Quando os solos são incubados como amostras únicas, preparam-se grandes quantidades de cada solo, tratado e de controlo, e vão-se retirando subamostras para análise, conforme necessário, ao longo do ensaio. A quantidade de solo inicialmente preparada para cada tratamento e para cada controlo depende do tamanho das subamostras a retirar durante o ensaio, do número de repetições a realizar e do número máximo de tempos de amostragem previsto. Os solos incubados como amostras únicas devem ser misturados vigorosamente antes de cada subamostragem. Quando os solos são incubados como uma série de amostras individualizadas, cada solo tratado e de controlo é inicialmente dividido no número de subamostras pretendido e estas utilizadas conforme necessário. Nas experiências em que se prevêem mais de dois tempos de amostragem, devem preparar-se subamostras em número suficiente para todas as repetições de todas as amostragens. Pelo menos, três repetições do solo de ensaio devem ser incubadas em condições aeróbias (ver secção 1.7.1.1). Os recipientes utilizados durante todos os testes devem possuir um volume livre suficiente para impedir o desenvolvimento de condições anaeróbias. Nos casos em que as substâncias de ensaio são voláteis, o ensaio só deve ser realizado com séries de subamostras individualizadas.

1.7.1.3. *Condições e duração dos ensaios*

O ensaio é realizado em câmara escura à temperatura de 20 ± 2°C. Durante o ensaio, o teor de humidade das amostras de solo deve ser mantido entre 40 % e 60 % da capacidade máxima de retenção de água do solo (ver secção 1.6.4.2), com uma variação máxima de ± 5 %. Sempre que necessário, pode adicionar-se água destilada ou desionizada.

A duração mínima do ensaio é de 28 dias. Nos ensaios de produtos químicos agrícolas, comparam-se as quantidades de dióxido de carbono libertado ou de oxigénio consumido entre as amostras tratadas e de controlo. Se estes valores diferirem em mais de 25 % após o 28.º dia, o ensaio continua até que essa diferença atinja um valor igual ou inferior a 25 % ou até ao 100.º dia. Para compostos químicos não agrícolas, o ensaio tem a duração de 28 dias. No 28.º dia, determinam-se as quantidades de dióxido de carbono libertado ou de oxigénio consumido nas amostras de solo tratadas e de controlo e calculam-se os valores de CE_X.

▼B

1.7.2. **Amostragem e análise dos solos**

1.7.2.1. *Calendário de amostragem dos solos*

Nos ensaios de produtos químicos agrícolas, analisam-se as taxas de respiração induzida pela glucose através das quantidades de dióxido de carbono libertado ou de oxigénio consumido nas amostras de solo nos dias 0, 7, 14 e 28. Caso seja necessário prolongar o ensaio, após o 28.º dia devem efectuar-se medições com intervalos de 14 dias.

Nos ensaios de produtos químicos não agrícolas, testa-se um mínimo de cinco concentrações de ensaio e a análise da taxa de respiração induzida pelo glucose efectua-se no início do ensaio (dia 0) e no fim do período de exposição (28.º dia). Nos casos em que tal se revele necessário, podem realizar-se medições intermédias — por exemplo ao 7.º dia. Os dados obtidos ao 28.° dia são utilizados para determinar o valor de CE_x para o produto químico. Se desejado, os dados obtidos para a amostra de controlo no dia 0 podem ser utilizados para indicar as quantidades iniciais de biomassa microbiana metabolicamente activa no solo (12).

1.7.2.2. *Medida das taxas de respiração induzida por glucose*

Para cada repetição de cada amostra de solo, tratada e de controlo, determina-se a taxa de respiração induzida por glucose em cada tempo de amostragem. As amostras de solo são misturadas com uma quantidade de glucose suficiente para provocar uma resposta máxima de respiração imediata. A quantidade de glucose necessária para provocar a resposta máxima de respiração de um dado solo pode ser determinada através de um teste preliminar usando uma série de concentrações de glucose (14). Contudo, para solos arenosos com 0,5 a 1,5 % de carbono orgânico, 2 000 a 4 000 mg de glucose por kg de solo (peso seco) são, em geral, suficientes. A glucose pode ser pulverizada com areia limpa de quartzo [10 g areia/kg de solo (peso seco)] e misturada com o solo de forma homogénea.

As amostras de solo adicionadas de glucose são incubadas num aparelho adequado para a determinação de taxas de respiração, em regime contínuo, de hora a hora ou de duas em duas horas (ver secção 1.6.1) a 20±2ºC. O dióxido de carbono libertado, ou o oxigénio consumido, é medido durante 12 horas consecutivas e as medições devem iniciar-se logo que possível, isto é, 1 ou 2 horas após o suplemento de glucose. A partir dos dados obtidos, determinam-se as quantidades totais de dióxido de carbono libertado, ou de oxigénio consumido, durante as 12 horas, assim como as taxas médias de respiração.

2. **DADOS**

2.1. TRATAMENTO DE RESULTADOS

Nos ensaios efectuados com produtos químicos agrícolas, regista-se a quantidade de dióxido de carbono libertado, ou de oxigénio consumido, em cada repetição de cada amostra de solo e os valores médios do conjunto de repetições devem ser apresentados numa tabela. Os resultados devem ser avaliados usando métodos estatísticos usuais e adequados (por exemplo, Teste-F, nível de significância de 5 %). As taxas de respiração induzida pela glucose expressam-se em mg dióxido de carbono/kg solo (peso seco)/h ou mg oxigénio/kg solo (peso seco)/h. A taxa média de formação de dióxido de carbono, ou a taxa média de consumo de oxigénio, em cada tratamento é comparada com a da amostra de controlo, calculando-se o desvio, em percentagem, da amostra de teste relativamente ao controlo.

▼B

Nos ensaios efectuados com produtos químicos não agrícolas, determinam-se as quantidades de dióxido de carbono libertado, ou de oxigénio consumido, em cada repetição e traça-se uma curva de dose-resposta para estimar os valores de CE_X. As taxas de respiração induzida pela glucose [isto é, mg dióxido de carbono/kg solo (peso seco)/h ou mg oxigénio/kg solo (peso seco)/h] obtidas para as amostras tratadas após 28 dias são comparadas com as obtidas para as amostras de controlo. A partir destes resultados, calculam-se os valores percentuais de inibição para cada concentração de ensaio. As percentagens obtidas são representadas num gráfico em função da concentração e, usando procedimentos estatísticos, determinam-se os valores de CE_x. Os limites de confiança (p = 0,95) para os valores de CE_x calculados são igualmente determinados usando métodos-padrão (15) (16) (17).

2.2. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Quando, na avaliação dos resultados dos ensaios com produtos químicos agrícolas, a diferença entre as taxas de respiração entre o tratamento com a menor concentração (isto é, correspondente à máxima concentração prevista para a situação real) e a respectiva amostra de controlo for igual ou inferior a 25 % em qualquer amostragem efectuada após o 28.º dia, o produto pode ser considerado como não tendo influência a longo prazo na transformação de carbono dos solos. Para ensaios envolvendo produtos químicos não agrícolas, os valores CE_{50}, CE_{25} ou CE_{10} são utilizados como indicadores.

3. **RELATÓRIO**

RELATÓRIO DO ENSAIO

O relatório do ensaio deve incluir a seguinte informação:

Identificação completa do solo utilizado, incluindo:

— referência geográfica do local (latitude, longitude),

— informação sobre a caracterização histórica do local (isto é, coberto vegetal, tratamentos com produtos de protecção das culturas agrícolas, tratamentos com fertilizantes, contaminações acidentais, etc.),

— uso do solo (por exemplo, solo agrícola, floresta, etc.),

— profundidade de amostragem (cm),

— teor de areia/lama/argila (% peso seco),

— pH (em água),

— teor de carbono orgânico (% peso seco),

— teor de azoto (% peso seco),

— capacidade de permuta catiónica (mmol/kg),

— biomassa microbiana inicial, em termos de percentagem de carbono orgânico total,

— referência dos métodos usados na determinação de cada parâmetro,

— toda a informação relacionada com a recolha e armazenamento das amostras de solo,

— pormenores sobre a pré-incubação do solo, quando exista.

▼B

Substância de ensaio:

— natureza física e, quando relevante, propriedades físico-químicas,

— dados de identificação química, sempre que relevantes, incluindo fórmula estrutural, pureza (teor do componente activo, em percentagem, no caso dos produtos de protecção de culturas agrícolas), teor de azoto.

Condições de ensaio:

— pormenores sobre a correcção do solo com substrato orgânico,

— número de concentrações do produto químico de ensaio que foram testadas e, quando adequado, justificação das concentrações de ensaio escolhidas,

— pormenores sobre a aplicação da substância de ensaio no solo,

— temperatura de incubação,

— teor de humidade do solo no início e durante o ensaio,

— método usado na incubação do solo (isto é, como amostra única ou como séries de subamostras individualizadas),

— número de repetições,

— tempos de amostragem;

Resultados:

— método e equipamento usado para a medição das taxas de respiração,

— tabelas de resultados, incluindo valores individuais e valores médios para as quantidades de dióxido de carbono ou oxigénio,

— variação entre repetições nas amostras tratadas e nas amostras de controlo,

— explicação das correcções efectuadas nos cálculos, quando relevantes,

— a variação percentual da taxa de respiração induzida pela glucose em cada ponto de amostragem ou, quando adequado, o valor de CE_{50} com um limite de confiança de 95 %, ou outros valores de CE_x (isto é, CE_{25} ou CE_{10}), com os respectivos intervalos de confiança, e a representação gráfica da curva de dose-resposta,

— tratamento estatístico dos resultados, quando apropriado,

— toda a informação e observações úteis para a interpretação dos resultados.

4. **REFERÊNCIAS**

(1) EPPO (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7: Soil Microflora. EPPO Bulletin 24: 1-16, 1994.

(2) BBA (1990). Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1-1 (2.ª edição, 1990).

(3) EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. 28 de Setembro de 1987.

▼B

(4) SETAC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M. R. Lynch, Pub. SETAC-Europa, Bruxelas.

(5) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Itália, 18-20 de Janeiro de 1995.

(6) ISO 10381-6 (1993). Soil quality — Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(7) Anderson, J. P. E. (1987). Handling and Storage of Soils for Pesticide Experiments, in «Pesticide Effects on Soil Microflora». Eds. L. Somerville and M. P. Greaves, Capítulo 3: 45-60.

(8) Anderson, J. P. E. (1982). Soil Respiration, in «Methods of Soil Analysis — Part 2: Chemical and Microbiological Properties». Agronomy Monograph N^{o} 9. Eds. A. L. Page, R. H. Miller and D. R. Keeney. 41:831- 871.

(9) ISO 11266-1. (1993). Soil Quality — Guidance on Laboratory Tests for Biodegradation in Soil: Part 1. Aerobic Conditions.

(10) ISO 14239 (1997E). Soil Quality — Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions.

(11) Heinemeye, O., Insam, H., Kaiser, E. A, e Walenzik, G. (1989). Soil microbial biomass and respiration measurements; an automated technique based on infrared gas analyses. Plant and Soil, 116: 77-81.

(12) ISO 14240-1 (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 1: Substrate-induced respiration method.

(13) ISO 14240-2 (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 2: Fumigation-extraction method.

(14) Malkomes, H.-P. (1986). Einfluβ von Glukosemenge auf die Reaktion der Kurzzeit-Atmung im Boden Gegenüber Pflanzenschutzmitteln, Dargestellt am Beispiel eines Herbizide. (Influence of the Amount of Glucose Added to the Soil on the Effect of Pesticides in Short-Term Respiration, using a Herbicide as an Example). Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd., Braunschweig, 38: 113-120.

(15) Litchfield, J. T. e Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 99-113.

(16) Finney, D. J. (1971). Probit Analysis. 3.^{a} edição, Cambridge, Londres e Nova Iorque.

(17) Finney D. J. (1978). Statistical Methods in Biological Assay. Griffin, Weycombe, Reino Unido.

▼B

C.23. TRANSFORMAÇÕES AERÓBIAS E ANAERÓBIAS NO SOLO

1. MÉTODO

O presente método baseia-se na publicação OECD TG 307 (2002).

1.1. INTRODUÇÃO

O presente Método de Ensaio baseia-se nas orientações existentes (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). O método descrito no presente Método de Ensaio foi concebido para avaliar as transformações aeróbias e anaeróbias de produtos químicos no solo. As experiências a realizar têm como objectivo a determinação (i) da taxa de transformação da substância de ensaio e (ii) da natureza e taxas de formação e degradação de produtos de transformação a que as plantas e organismos do solo possam ser expostos. Os estudos descritos neste Método de Ensaio são requeridos quer para produtos químicos directamente aplicados no solo quer para substâncias que o possam vir a atingir. Os resultados dos presentes estudos laboratoriais poderão igualmente vir a ser utilizados para o desenvolvimento de protocolos de amostragem e análise em áreas de estudo relacionadas.

Para a avaliação das vias de transformação, é geralmente suficiente a realização de estudos aeróbios e anaeróbios com um único tipo de solo (8) (10) (11). Pelo contrário, a determinação das taxas de transformação deverá basear-se em análises efectuadas em, pelo menos, mais três solos diferentes (8) (10).

O número e tipos de solos que devem ser utilizados no presente ensaio foram acordados numa reunião de trabalho da OCDE sobre selecção de solos e sedimentos, que decorreu em Belgirate, Itália, em 1995 (10). Os tipos de solos a ensaiar devem ser representativos das condições ambientais onde a substância de ensaio virá a ser utilizada ou libertada no ambiente. Por exemplo, os produtos químicos que podem vir a ser libertados em climas subtropicais a tropicais devem ser ensaiados com Ferrasoles ou Nitosoles (sistema FAO). Da referida reunião saíram igualmente recomendações relativas à recolha, manipulação e armazenamento das amostras de solos, tendo como base a Orientação ISO (15). No presente método considera-se igualmente a utilização de solos de arrozais *paddy*.

1.2. DEFINIÇÕES

Substância de ensaio: Qualquer substância, quer se trate do composto inicial ou de produtos de transformação relevantes.

Produtos de transformação: Todas as substâncias resultantes de reacções de transformação bióticas ou abióticas da substância de ensaio, incluindo CO_2 e produtos presentes nos resíduos ligados.

Resíduos ligados: Os «resíduos ligados» representam compostos presentes no solo, planta ou animal, que, após extracção, persistam na matriz, quer na forma da substância inicial quer como um dos seus metabolitos/produtos de transformação. O método de extracção não poderá alterar substancialmente nem os próprios compostos nem a estrutura da matriz. A natureza da ligação poderá ser parcialmente determinada utilizando métodos extractivos que alterem a matriz e através de técnicas analíticas sofisticadas. Têm sido identificadas deste modo, por exemplo, ligações do tipo covalente, iónico e de absorção/adsorção, assim como encapsulação. De um modo geral, a formação de resíduos ligados reduz significativamente a bioacessibilidade e a biodisponibilidade das substâncias (12) [adaptado de IUPAC 1984 (13)].

Transformação aeróbia: Reacções que ocorrem na presença de oxigénio molecular (14).

▼B

Transformação anaeróbia: Reacções que ocorrem na ausência de oxigénio molecular (14).

Solo: Mistura de componentes abióticos (constituintes químicos minerais e orgânicos, em que os últimos incluem compostos com elevado conteúdo de carbono e azoto e de peso molecular elevado) e bióticos (pequenos organismos vivos, maioritariamente microorganismos). O solo pode ser manuseado em dois estados distintos:

(a) não perturbado, tal como se desenvolveu ao longo do tempo, em camadas características de vários tipos de solos;

(b) perturbado, tal como é normalmente encontrado em campos aráveis ou como se apresenta quando a recolha de amostras para utilização no presente método de ensaio é feita por escavação (14).

Mineralização: Degradação completa de um composto orgânico em CO_2 e H_2O, em condições aeróbias, ou em CH_4, CO_2 e H_2O em condições anaeróbias. No contexto do presente método de ensaio, quando se utiliza um composto marcado com ^{14}C, o termo mineralização refere-se à sua degradação extensa, envolvendo a oxidação de um átomo de carbono marcado e a libertação da quantidade correspondente de $^{14}CO_2$ (14).

Semivida: $t_{0,5}$, é o tempo necessário para a transformação de 50 % da substância de ensaio, nos casos em que a transformação pode ser descrita por uma cinética de primeira ordem. A semivida da substância é independente da sua concentração.

DT_{50} **(Tempo de Desaparecimento 50):** Tempo necessário para reduzir a concentração da substância de ensaio em 50 %; nos casos em que a transformação não segue uma cinética de primeira ordem, o valor de DT_{50} è diferente de $t_{0,5}$ (semivida).

DT_{75} (Tempo de Desaparecimento 75): Tempo necessário para reduzir a concentração da substância de ensaio em 75 %.

DT_{90} (Tempo de Desaparecimento 90): Tempo necessário para reduzir a concentração da substância de ensaio em 90 %.

1.3. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

A caracterização e/ou identificação dos produtos de transformação através de métodos espectroscópicos e cromatográficos deverá envolver a utilização de substâncias de referência.

1.4. APLICABILIDADE DO ENSAIO

O método é aplicável a todas as substâncias químicas (não marcadas ou marcadas radioactivamente) para as quais se encontre disponível um método analítico suficientemente sensível e preciso. É aplicável a compostos ligeiramente voláteis, não voláteis, solúveis ou insolúveis em água. O ensaio não deve ser aplicado a compostos químicos muito voláteis a partir do solo (por exemplo, fumigantes, solventes orgânicos) já que estes, nas condições experimentais descritas, não podem ser mantidos no solo.

▼B

1.5. INFORMAÇÃO SOBRE A SUBSTÂNCIA DE ENSAIO

Enquanto para a medição da taxa de transformação poderão ser utilizadas substâncias de ensaio marcadas ou não marcadas, para o estudo da via de transformação e para o estabelecimento do balanço de massa é necessária a utilização de compostos marcados. A marcação recomendada é com ^{14}C, embora a utilização de outros isótopos, tais como ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H e ^{32}P, possa igualmente revelar-se útil. A marcação deve ser feita, tanto quanto possível, na(s) zona(s) mais estável(eis) da molécula ([1]). A pureza da substância de ensaio deve ser de, pelo menos, 95 %.

Antes de efectuar um ensaio sobre transformação aeróbia ou anaeróbia no solo, deve estar disponível a seguinte informação sobre a substância de ensaio:

(a) solubilidade em água (Método A.6)

(b) solubilidade em solventes orgânicos;

(c) pressão de vapor (Método A.4) e constante da lei de Henry;

(d) coeficiente de partição n-octanol/água (Método A.8);

(e) estabilidade química no escuro (hidrólise) (Método C.7);

(f) pK_a se a molécula puder sofrer protonação ou desprotonação [Norma de Ensaio 112 da OCDE] (16).

Poderão ser úteis outras informações como, por exemplo, a existência de dados relativos à toxicidade da substância de ensaio para os microorganismos do solo [Métodos de Ensaio C.21 e C.22] (16).

Deverão estar disponíveis métodos analíticos (incluindo métodos de extracção e erradicação) que permitam a quantificação e identificação tanto da substância de ensaio como dos seus produtos de transformação.

1.6. PRINCIPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

As amostras de solo são tratadas com a substância de ensaio e incubadas no escuro em balões biométricos ou em sistemas de fluxo em condições laboratoriais controladas (com temperatura e humidade do solo constantes). A intervalos de tempo adequados, extraem-se amostras de solo que são analisadas relativamente à substância inicial e aos seus produtos de transformação. Os produtos voláteis são igualmente recolhidos para análise utilizando dispositivos de absorção adequados. A utilização de material marcado com ^{14}C permite a determinação das várias taxas de mineralização da substância de ensaio através da recolha do $^{14}CO_2$ libertado e o estabelecimento de um balanço de massa que inclui a formação de resíduos ligados ao solo.

1.7. CRITÉRIOS DE QUALIDADE

1.7.1. **Recuperação**

A extracção e análise de amostras de solo, pelo menos em duplicado imediatamente após a adição da substância de ensaio, fornece uma primeira indicação relativa à repetitividade do método analítico e à uniformidade do procedimento de aplicação da substância de ensaio. Os valores de recuperação em fases mais adiantadas das experiências são obtidos através dos respectivos balanços de massa. Os valores de recuperação devem variar entre 90 % e 110 % no caso de produtos químicos marcados (8) e entre 70 % e 110 % no caso de produtos químicos não marcados (3).

([1]) Por exemplo, se a estrutura da substância de ensaio inclui um anel, este deverá ser marcado; no caso de a substância de ensaio possuir dois ou mais anéis, poderá ser necessário efectuar estudos independentes de modo a avaliar o destino de cada um dos anéis marcados e obter informação adequada sobre a formação dos produtos de transformação.

▼B

1.7.2. **Repetitividade e sensibilidade do método analítico**

A repetitividade do método analítico (com excepção da eficiência de extracção inicial) na quantificação da substância de ensaio e dos produtos de transformação pode ser verificada pela análise em duplicado do mesmo extracto de solo, após incubação durante o tempo suficiente para que ocorra a formação de produtos de transformação.

O limite de detecção (LD) do método analítico, tanto para a substância de ensaio como para os produtos de transformação, deve corresponder, no mínimo, ao menor dos seguintes valores: 0,01 mg kg^{-1} de solo (como substância de ensaio) ou 1 % da dose aplicada. Deve ser igualmente especificado o limite de quantificação (LQ).

1.7.3. **Precisão dos dados de transformação**

A análise de regressão das concentrações da substância de ensaio em função do tempo fornece informação apropriada sobre a fiabilidade da curva de transformação e permite o cálculo dos limites de confiança para as semividas (no caso de cinética de pseudoprimeira ordem) ou os valores de DT_{50} e, se adequado, os valores de DT_{75} e de DT_{90}.

1.8. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.8.1. **Equipamento e reagentes químicos**

Os sistemas de incubação consistem em sistemas estáticos fechados ou em sistemas de fluxo adequados (7)(17), dos quais se representam exemplos nas figuras 1 (aparelho adequado para a incubação de solos em sistema de fluxo) e 2 (balão biométrico). Ambos os tipos de sistemas de incubação apresentam vantagens e limitações (7)(17).

Para além do material corrente de laboratório, é necessário o seguinte:

— Instrumentos analíticos, tais como equipamento de GLC, HPLC, TLC, incluindo os sistemas de detecção apropriados para a análise de substâncias marcadas radioactivamente ou não marcadas ou o método de diluição inversa de isótopos;

— Instrumentos para fins de identificação (por exemplo, MS, GC-MS, HPLC-MS, NMR, etc.);

— Contador de cintilações;

— Câmara de combustão oxidante para combustão do material radioactivo;

— Centrífuga;

— Aparelhos de extracção (por exemplo, tubos de centrífuga para extracção a frio e aparelho de Soxhlet para extracção contínua em refluxo);

— Instrumentação para concentração de soluções e extractos (por exemplo, evaporador rotativo);

— Banho de água;

— Dispositivo para mistura mecânica (por exemplo, máquina de amassar, misturador rotativo).

▼B

Os reagentes químicos a utilizar incluem, por exemplo:

— NaOH, qualidade analítica, 2 mol . dm^{-3}, ou outra base adequada (por exemplo, KOH, etanolamina);

— H_2SO_4, qualidade analítica, 0,05 mol . dm^{-3};

— Etilenoglicol, qualidade analítica;

— Materiais sólidos de adsorção, tais como cal de soda e pastilhas de poliuretano;

— Solventes orgânicos, qualidade analítica, tais como acetona, metanol, etc.;

— Líquido de cintilação.

1.8.2. **Aplicação da substância de ensaio**

Com vista à sua adição e distribuição no solo, a substância de ensaio pode ser dissolvida em água (desionizada ou destilada) ou, quando necessário, em quantidades mínimas de acetona ou de outros solventes orgânicos (6) em que a substância de ensaio seja suficientemente solúvel e estável. Neste caso, a quantidade do solvente seleccionado não deverá ter uma influência significativa na actividade microbiana do solo (ver secções 1.5 e 1.9.2-1.9.3). Deverá igualmente evitar-se a utilização de solventes que inibam a actividade microbiana, tais como clorofórmio, diclorometano e outros solventes halogenados.

A substância de ensaio pode também ser adicionada na forma sólida, por exemplo, misturada com areia de quartzo (6) ou com uma pequena subamostra do solo a ensaiar que tenha sido previamente seca ao ar e esterilizada. Neste caso, se a substância de ensaio foi adicionada utilizando um solvente, dever-se-á permitir a evaporação deste antes da adição da subamostra contendo a substância de ensaio à amostra original, não estéril, de solo.

No caso de produtos químicos de ocorrência comum, cuja via principal de entrada no solo é através de lamas de esgotos ou actividades agrícolas, a substância de ensaio deverá ser adicionada às lamas que são em seguida introduzidas na amostra de solo (ver secções 1.9.2 e 1.9.3).

Embora a utilização sistemática de produtos formulados não seja recomendada, em algumas situações, como por exemplo, no caso de substâncias de ensaio pouco solúveis, a utilização deste tipo de produtos pode constituir uma alternativa apropriada.

1.8.3. **Solos**

1.8.3.1. *Selecção de solos*

Para a determinação da via de transformação, poderá utilizar-se um solo representativo. Nestes casos, recomenda-se a escolha de um solo areno-limoso, franco-limoso, limoso ou limo-arenoso [de acordo com a classificação da FAO e da USDA (18)] com um pH entre 5,5 - 8,0, um conteúdo de carbono orgânico entre 0,5 - 2,5 % e uma biomassa microbiana de, pelo menos, 1 % do carbono orgânico total (10).

Para estudos de taxas de transformação, devem utilizar-se pelo menos mais três solos, que deverão ser representativos de uma gama de solos relevante e cujo teor em carbono orgânico, pH, argila e biomassa microbiana deverá variar (10).

▼B

Todos os solos deverão ser caracterizados, pelo menos, em relação à sua textura (% de areia, % de silte, % de argila) [de acordo com a classificação da FAO e da USDA (18)], pH, capacidade de troca catiónica, carbono orgânico, densidade aparente, características de retenção de água ([1]) e biomassa microbiana (apenas no caso de estudos aeróbios); no entanto, a disponibilidade de outras informações relativas às propriedades do solo poderá ser útil para a interpretação dos resultados. Com vista à determinação das características 4o solo, podem ser utilizados os métodos recomendados nas referências (19)(20)(21)(22)(23). A biomassa microbiana deverá ser determinada pelo método da respiração induzida pelo substrato (SIR) (25)(26) ou por métodos alternativos (20).

1.8.3.2. *Recolha, manuseamento e armazenamento de solos*

Deve estar disponível informação pormenorizada sobre a história do local de recolha do solo a ensaiar, que inclua: a localização exacta, o coberto vegetal, o eventual tratamento com produtos químicos, fertilizantes orgânicos e inorgânicos, a adição de matéria biológica ou outras contaminações. No caso de terem sido tratados com a substância de ensaio ou seus análogos estruturais nos quatro anos imediatamente anteriores, os solos não devem ser utilizados para estudos de transformação (10) (15),

A amostra de solo deverá ter sido recolhida recentemente (do horizonte A ou até 20 cm da camada superior) e o seu conteúdo de água deverá ser tal que facilite a crivagem. Para outros solos que não os provenientes de arrozais *paddy*, deve evitar-se a amostragem durante ou imediatamente após longos períodos (> 30 dias) de seca, gelo ou inundação (14). Na medida do possível, as amostras devem ser transportadas de modo a minimizar alterações no conteúdo de água do solo e devem ser mantidas no escuro, em condições de boa ventilação. Para este fim, é geralmente adequada a utilização de sacos de polietileno fechados frouxamente.

Após a recolha, o solo deverá ser processado tão depressa quanto possível. Após a remoção da vegetação, fauna macroscópica e pedras, o solo é passado através de um peneiro de 2 mm, que remove as pequenas pedras e restos da fauna e plantas. Antes da crivagem, devem evitar-se a secagem e o esmagamento extensivos do solo (15).

Nos casos em que a recolha das amostras é difícil durante o Inverno (solo congelado ou coberto de camadas de neve), a amostragem poderá ser feita a partir de um lote de solo armazenado numa estufa e coberto por vegetação (por exemplo, erva ou misturas de erva e trevo). Embora haja uma acentuada preferência por estudos efectuados com solos recolhidos na altura, nos casos em que o solo recolhido e processado tenha de ser armazenado antes do início do estudo, as condições de armazenamento devem ser adequadas e de curta duração (4 ± 2 °C durante três meses, no máximo) de modo a manter a actividade microbiana ([2]). Nas referências (8) (10) (15) (26) (27) podem encontrar-se instruções pormenorizadas sobre a recolha, o manuseamento e o armazenamento de solos para utilização em experiências de biotransformação.

([1]) As características de retenção de água de um solo podem ser medidas como capacidade de campo, capacidade de retenção de água ou tensão de sucção de água (pF). Consultar o apêndice 1 para mais pormenores. No relatório deverá referir-se se as características de retenção de água e densidade aparente dos solos foram determinadas em amostras de campo não perturbadas ou em amostras perturbadas (processadas).

([2]) Resultados de investigações recentes indicam que solos provenientes de zonas temperadas podem igualmente ser armazenados a - 20°C durante períodos superiores a três meses (28) (29) sem se registarem perdas significativas de actividade microbiana.

▼B

Antes da utilização do solo processado para o presente ensaio, este deve ser pré-incubado de modo a permitir a germinação e remoção das sementes e o restabelecimento do equilíbrio do metabolismo microbiano após a passagem de condições de amostragem ou armazenamento para condições de incubação. De modo a aproximar as condições de temperatura e humidade daquelas que serão utilizadas no ensaio, a pré-incubação durante um período de 2 a 28 dias) é geralmente adequada (15). No total, os períodos de armazenamento e pré-incubação não devem exceder três meses.

1.9. PROCEDIMENTO DO ENSAIO

1.9.1. **Condições do ensaio:**

1.9.1.1. *Temperatura de ensaio*

Ao longo de todo o período do ensaio, os solos devem ser incubados no escuro e a uma temperatura constante e representativa das condições climáticas onde ocorrerá o uso ou libertação da substância. Relativamente a todas as substâncias de ensaio que possam vir a atingir o solo em climas temperados, a temperatura recomendada é de 20 ± 2 °C. A temperatura deve ser monitorizada.

No caso de produtos químicos aplicados ou libertados em climas mais frios (por exemplo, em países do Norte, durante o Outono ou o Inverno), devem ser incubadas amostras de solo adicionais a uma temperatura inferior (por exemplo, 10 ±2 °C).

1.9.1.2. *Teor de humidade*

No caso de ensaios de transformação em condições aeróbias, o teor de humidade do solo ([1]) deve ser ajustado e mantido a um valor de pF entre 2,0 e 2,5 (3). O teor de humidade do solo é expresso em massa de água por massa de solo seco e deve ser controlado regularmente (por exemplo, de 2 em 2 semanas) por pesagem dos balões de incubação, devendo as perdas de água ser compensadas por adição de água (de preferência, água da torneira esterilizada por filtração). Durante a adição de água devem tomar-se precauções com vista a evitar ou minimizar perdas da substância de ensaio e/ou dos produtos de transformação por volatilização e/ou fotodegradação (caso ocorra).

No caso de ensaios de transformação em condições anaeróbias ou de solos *paddy*, o solo é saturado com água por inundação.

1.9.1.3. *Condições de incubação aeróbia*

No caso de sistemas de fluxo, as condições aeróbias serão mantidas através de ciclos de lavagem ou por ventilação contínua com ar humidificado. No caso de balões biométricos, a permuta de a ré mantida por difusão.

1.9.1.4. *Condições aeróbias estéreis*

Com vista à obtenção de informações relativas à relevância da transformação abiótica de uma substância de ensaio, as amostras de solo podem ser esterilizadas (para informações sobre métodos de esterilização, consultar as referências 16 e 29), tratadas com a substância de ensaio estéril (por exemplo, por adição da solução através de um filtro estéril) e arejadas com ar humidificado estéril, tal como descrito na secção 1.9.1.3. No caso de solos *paddy*, tanto o solo como a água devem ser esterilizados e a incubação deve ser efectuada tal como descrito na secção 1.9.1.6.

([1]) O solo não deve estar nem demasiado molhado nem demasiado seco de modo a manter uma ventilação e alimentação adequadas da microflora. Os teores de humidade recomendados para um crescimento microbiano óptimo variam entre 40 % e 60 % da capacidade de retenção de água (WHC) e entre 0,1 e 0,33 bar (6). Este último intervalo é equivalente a uma gama de pF entre 2,0 e 2,5. No apêndice 2 apresentam-se os teores de humidade típicos para vários tipos de solos.

▼B

1.9.1.5. *Condições de incubação anaeróbia*

De modo a estabelecer e manter condições anaeróbias, o solo tratado com a substância de ensaio é inicialmente incubado em condições aeróbias durante 30 dias, uma semivida ou DT_{50} (escolher a opção mais curta), após o que é coberto de água (camada de água de 1--3 cm) e o sistema de incubação lavado com um gás inerte (por exemplo, azoto ou árgon) ([1]). O sistema de ensaio deve permitir a realização de medições de pH, concentração de oxigénio e potencial redox, e incluir dispositivos de retenção de produtos voláteis. O sistema de balões biométricos deve ser fechado de modo a evitar a entrada de ar por difusão.

1.9.1.6. *Condições de incubação paddy*

De modo a estudar a transformação em solos de arrozais *paddy*, o solo é coberto com uma camada de água de 1-5 cm e a substância de ensaio é aplicada na fase aquosa (9). A profundidade mínima do solo recomendada é de 5 cm. O sistema é ventilado com ar, tal como descrito para as condições aeróbias. Os valores de pH, concentração de oxigénio e potencial redox da camada aquosa devem ser monitorizados e incluídos no relatório. O início dos estudos de transformação deve ser precedido de um período de pré-incubação de, pelo menos, duas semanas (ver secção 1.8.3.2).

1.9.1.7. *Duração do ensaio*

Os estudos de taxa e via de transformação não devem normalmente exceder 120 dias ([2]) (3) (6) (8), pois após este período é de esperar uma diminuição da actividade microbiana do solo num sistema laboratorial artificial e isolado dos sistemas naturais de reposição de nutrientes. Sempre que seja necessário caracterizar o desaparecimento da substância de ensaio e a formação e desaparecimento dos principais produtos de transformação, os estudos poderão ser prolongados (por exemplo, 6 ou 12 meses) (8). O prolongamento do ensaio deverá ser justificado no relatório de ensaio e acompanhado de medições de biomassa realizadas durante e no final desses períodos.

1.9.2. **Princípio do ensaio**

Em cada balão de incubação (ver figuras 1 e 2 do apêndice 3) coloca-se cerca de 50g a 200 g de solo (peso seco), que é tratado com a substância de ensaio utilizando um dos métodos descritos na secção 1.8.2. Caso se utilizem solventes orgânicos para a aplicação da substância de ensaio, estes devem ser removidos do solo por evaporação. 0 solo deverá ser muito bem mexido, utilizando uma espátula e/ou por agitação do balão. Se o ensaio for conduzido em condições de arrozal *paddy*, o solo e a água devem ser muito bem misturados após a aplicação da substância de ensaio. De modo a verificar a uniformidade da distribuição da substância de ensaio, esta deverá ser analisada em pequenas alíquotas (por exemplo, 1 g) dos solos tratados. Em alternativa, poderá ser utilizado um outro método, que se descreverá mais à frente.

([1]) As condições aeróbias são as que predominam em solos superficiais e mesmo em solos subsuperficiais, tal como foi demonstrado num projecto de investigação financiado pela UE [K. Takagi *et al.* (1992). Microbial diversity and activity in subsoils: Methods, field site, seasonal variation in subsoil temperatures and oxygen contents. Proc. Intemat. Symp. Environm. Aspects Pesticides Microbiol., 270-277, 17-21 August 1992, Sigtuna, Sweden]. A ocorrência de condições anaeróbias é ocasional, verificando-se apenas durante a inundação dos solos após precipitação intensa ou quando são estabelecidas condições *paddy* (em arrozais).

([2]) Os estudos aeróbios poderão ser terminados muito antes de decorridos 120 dias, desde que se tenha manifestamente atingido o final da mineralização e da via de transformação. A conclusão do teste poderá ocorrer após 120 dias ou quando pelo menos 90 % da substância de ensaio tiver sido transformada, mas apenas se se tiver formado, no mínimo, 5 % de CO_2.

▼B

A taxa de tratamento deverá corresponder à maior taxa de aplicação de um produto de protecção de culturas que é recomendada nas instruções de utilização e a uma incorporação uniforme até uma profundidade adequada no campo (por exemplo, camada superficial de 10 cm de solo ([1]). Por exemplo, para produtos químicos aplicados na folhagem ou no solo sem incorporação, a profundidade apropriada para o cálculo de quantidade de produto químico a adicionar a cada balão é de 2,5 cm. No caso de produtos químicos incorporados no solo, a profundidade apropriada é a profundidade de incorporação especificada nas instruções de utilização. No caso de produtos químicos de ocorrência comum, a taxa de aplicação deve ser estimada com base na via de entrada mais relevante. Por exemplo, quando as lamas de esgotos constituem a principal via de entrada no solo, o produto químico deve ser adicionado às lamas a uma concentração que reflecte a sua concentração esperada e a quantidade de lamas adicionadas ao solo deve reflectir a sua carga habitual em solos agrícolas. Se esta concentração não for suficientemente elevada para que se possam identificar os principais produtos de transformação, poderá ser útil a incubação de amostras de solo independentes contendo taxas mais elevadas, embora devam ser evitadas taxas excessivas que possam influenciar as funções microbianas do solo (ver secções 1.5 e 1.8.2).

Alternativamente, poderá tratar-se uma maior quantidade de solo (ou seja, 1 kg a 2 kg) com a substância de ensaio; depois de ser cuidadosamente misturado numa máquina misturadora apropriada, o solo tratado será então dividido em pequenas porções de 50 g a 200 g e transferido para os balões de incubação (por exemplo, utilizando divisores de amostras). Também neste caso deverão ser analisados pequenas alíquotas do lote de solo tratado (por exemplo, 1 g), de modo a determinar a uniformidade da distribuição da substância de ensaio. Este procedimento apresenta a vantagem de permitir uma distribuição mais uniforme da substância de ensaio no solo, pelo que será preferível a sua utilização.

Deverão ser igualmente incubadas, nas mesmas condições (aeróbias), que as amostras tratadas com a substância de ensaio, amostras de solo não tratadas; estas amostras serão utilizadas para medições de biomassa durante e no final dos estudos.

Nos casos em que a substância de ensaio é aplicada no solo dissolvida em solvente(s) orgânico(s), deverão ser incubadas, nas mesmas condições (aeróbias) que as amostras tratadas com a substância de ensaio, amostras de solo tratadas com a mesma quantidade de solvente(s) (sem adição da substância em ensaio). Estas amostras são utilizadas para medições de biomassa no início, durante e no final dos estudos de modo a verificar os efeitos do(s) solvente(s) na biomassa microbiana.

Os balões contendo o solo tratado podem ser ligados ao sistema de fluxo descrito na Figura 1 ou tapados com a coluna de absorção ilustrada na figura 2 (ver apêndice 3).

([1]) O cálculo da concentração inicial com base na área utiliza a seguinte equação:

$$C_{solo}[mg/kg_{solo}] = \frac{A[kg/ha] \cdot 10^6[mg/kg]}{l[m] \cdot 10^4[m^2/ha] \cdot d[kg_{solo}/m^3]}$$

C_{solo} = Concentração inicial no solo [$mg \cdot kg^{-1}$]

A = Taxa de aplicação [$kg \cdot ha^{-1}$]; l = espessura da camada de solo no campo [m]; d = densidade aparente do solo seco [$kg \cdot m^{-3}$].

Em geral, uma taxa de aplicação de 1 kg ha^{-1} resulta numa concentração no solo de aproximadamente 1 $mg \cdot kg^{-1}$, numa camada de 10 cm (assumindo uma densidade aparente de 1 $g \cdot cm^{-3}$).

▼B

1.9.3 **Amostragem e medição**

A intervalos de tempo apropriados, removem-se dois balões de incubação, extraem-se as respectivas amostras de solo com solventes apropriados de polaridade diferente e analisa-se a substância de ensaio e/ou os produtos de transformação. Um estudo bem planeado deverá incluir um número de balões suficiente para que possam ser utilizados dois balões em cada ponto de amostragem. A intervalos de tempo variados durante a incubação de cada amostra de solo (intervalos de 7 dias durante o primeiro mês e de 17 dias nos meses subsequentes), e no final do período de incubação, as soluções de absorção ou os materiais sólidos de absorção deverão ser removidos e analisados relativamente à presença de produtos, voláteis. Para além de uma amostra de solo recolhida imediatamente após a aplicação da substância de ensaio (amostra do dia 0), deverão ser incluídos, pelo menos, 5 pontos de amostragem. Os intervalos de tempo deverão ser escolhidos de modo a possibilitar o estabelecimento do padrão de desaparecimento da substância de ensaio e dos padrões de formação e desaparecimento dos produtos de transformação (por exemplo, 0, 1, 3, 7 dias; 2, 3 semanas; 1, 2, 3 meses, etc.).

No caso de se utilizar uma substância de ensaio marcada com ^{14}C, a radioactividade não extractável será quantificada por combustão e será calculado um balanço de massa para cada intervalo de amostragem.

No caso de incubação anaeróbia ou *paddy*, as fases de solo e água podem ser analisadas conjuntamente para a substância de ensaio e produtos de transformação ou ser separadas por filtração ou centrifugação antes da extracção e análise.

1.9.4. **Ensaios opcionais**

A fim de estimar a influência da temperatura e humidade do solo nas taxas de transformação de uma substância de ensaio e/ou dos seus produtos de transformação no solo, poderá ser útil realizar estudos em condições aeróbias, não estéreis, noutras condições de temperatura e humidade.

Pode tentar-se uma caracterização mais aprofundada da radioactividade não extractável utilizando, por exemplo, extracção com fluidos supercríticos.

2. **DADOS**

2.1. TRATAMENTO DOS RESULTADOS

As quantidades de substância de ensaio, produtos de transformação, substâncias voláteis (apenas em percentagem) e produtos não extractáveis, devem ser indicadas na forma de percentagem da concentração aplicada inicialmente e, quando apropriado, em $mg\text{-}kg^{-1}$ de solo (com base em peso de solo seco), para cada intervalo de amostragem. Para cada um destes intervalos deverá ainda apresentar-se um balanço de massa, em percentagem da concentração aplicada inicialmente. A representação gráfica das concentrações da substância de ensaio em função do tempo permitirá estimar a sua semivida de transformação, ou DT_{50}. Os produtos dê transformação principais devem ser identificados e os valores das suas concentrações devem também ser representados graficamente em função do tempo a fim de evidenciar as suas taxas de formação e desaparecimento. Considera-se um produto de transformação principal qualquer produto cuja concentração seja ≥ 10 % da dose aplicada em qualquer altura ao longo do estudo.

Os produtos voláteis retidos fornecem alguma indicação sobre a capacidade de volatilização, a partir do solo, de uma substância de ensaio e dos seus produtos de transformação.

▼B

Devem ser determinados valores mais precisos para as semividas ou DT_{50} e se apropriado, para DT_{75} e DT_{90}, através da aplicação de modelos cinéticos apropriados. Os valores de semivida e de DT50 devem ser apresentados conjuntamente com a descrição do modelo utilizado, da ordem da cinética da reacção e do coeficiente de determinação (r^2). É preferível assumir uma cinética de primeira ordem, excepto se $r^2 < 0,7$. Quando apropriado, os cálculos devem ser igualmente aplicados aos produtos de transformação principais. As referências 31 a 35 descrevem exemplos de modelos apropriados.

No caso de estudos de taxas conduzidos a várias temperaturas, as taxas de transformação devem ser descritas em função da temperatura, dentro da gama de temperaturas utilizada experimentalmente, através duma relação de Arrhenius do tipo:

$$k = A \cdot e^{-B/T} \text{ or} \ln k = 1nA - \frac{B}{T},$$

em que ln A e B correspondem, respectivamente, aos parâmetros de regressão ordenada na origem e declive da melhor correlação linear obtida entre ln k e 1/T, k representa a constante de velocidade à temperatura T e T representa a temperatura em kelvin. Deve ter-se em atenção que a relação de Arrhenius é válida para um intervalo limitado de temperatura, no caso de a transformação ser influenciada pela acção microbiana.

2.2. AVALIAÇÃO E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Apesar de os estudos serem efectuados num sistema laboratorial artificial, os resultados permitirão obter uma estimativa da taxa de transformação da substância de ensaio, assim como da taxa de formação e desaparecimento dos produtos de transformação em condições de campo (36) (37).

O estudo da via de transformação de uma substância de ensaio fornece informação sobre o modo como a substância aplicada é estruturalmente modificada no solo por reacções químicas e microbianas.

3. **RELATÓRIO**

RELATÓRIO DO ENSAIO

O relatório do ensaio deve incluir o seguinte:

Substância de ensaio:

— nome vulgar, nome químico, número CAS, fórmula estrutural (com indicação da(s) posição(s) de marcação no caso da utilização de material marcado radioactivamente) e propriedades físico-químicas relevantes (ver secção 1.5),

— pureza (impurezas) da substância de ensaio,

— pureza radioquímica do produto químico marcado e actividade específica (quando apropriado).

Substâncias de referência:

— nome químico e estrutura das substâncias de referência utilizadas para a caracterização e/ou identificação dos produtos de transformação.

Solos utilizados no ensaio:

— características do local de recolha,

— data e procedimento utilizado para a recolha de amostras do solo,

▼B

— propriedades dos solos, tais como, pH, teor de carbono orgânico, textura (% de areia, % de silte, % de argila), capacidade de troca catiónica, densidade aparente, características de retenção de água e biomassa microbiana,

— duração e condições de armazenamento do solo (caso tenha sido armazenado).

Condições do ensaio:

— datas em que os estudos foram efectuados,

— quantidade de substância de ensaio aplicada,

— solventes utilizados e método de aplicação da substância de ensaio,

— peso do solo inicialmente tratado e retirado para análise em cada intervalo de tempo,

— descrição do sistema de incubação utilizado,

— taxas de fluxo de ar (apenas para sistemas de fluxo),

— temperatura do sistema experimental,

— teor de humidade do solo durante a incubação,

— biomassa microbiana no início, durante e no final dos estudos aeróbios,

— pH, concentração de oxigénio e potencial redox no início, durante e no final dos estudos anaeróbios e *paddy*,

— método(s) de extracção,

— métodos de quantificação e identificação da substância de ensaio e principais produtos de transformação no solo e materiais de absorção,

— número de repetições (duplicados) e número de controlos.

Resultados:

— resultado da determinação da actividade microbiana,

— repetitividade e sensibilidade dos métodos analíticos utilizados,

— taxas de recuperação (na secção 1.7.1 indicam-se os valores percentuais que deverão verificar-se para um estudo válido),

— tabelas de resultados expressos como percentagens da dose inicial aplicada e, quando apropriado, como mg-kg^{-1} de solo (com base no peso seco),

— balanço de massa durante e no final dos estudos,

— caracterização da radioactividade não extractável (ligada) ou de resíduos presentes no solo,

— quantificação do CO_2 e outros compostos voláteis libertados,

— gráficos representativos da concentração de substância de ensaio no solo e, quando apropriado, dos produtos de transformação principais, em função do tempo,

— valores de semivida ou DT_{50}, DT_{75} e DT_{90} para a substância de ensaio e, quando apropriado, para os produtos de transformação principais, incluindo os limites de confiança,

▼B

— estimativa da taxa de degradação abiótica em condições estéreis,

— uma avaliação da cinética de transformação da substância de ensaio e, quando apropriado, dos produtos de transformação principais,

— vias de transformação propostas, quando apropriado,

— discussão e interpretação dos resultados,

— dados experimentais (ou seja, exemplos de cromatogramas, exemplos de cálculos de taxas de transformação e métodos utilizados para identificar os produtos de transformação).

4. **REFERÊNCIAS**

(1) US Environmental Protection Agency (1982). Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.

(2) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada.

(3) Directiva 95/36/CE de 14 de Julho de 1995 que altera a Directiva 91/414/CEE relativa à colocação dos produtos fitofarmacêuticos no mercado. Parte A do Anexo II e Parte A do Anexo III: Destino e comportamento no ambiente.

(4) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1995). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

(5) BBA (1986). Richtlinie für die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4-1. Verbleib von Pflanzenschutzmitteln im Boden — Abbau, Umwandlung und Metabolismus.

(6) ISO/DIS 11266-1 (1994). Soil Quality-Guidance on laboratory tests for biodegradation of organic chemicals in soil — Part 1: Aerobic conditions.

(7) ISO 14239 (1997). Soil Quality — Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions.

(8) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.

(9) MAFF — Japan 2000 — Draft Guidelines for transformation studies of pesticides in soil — Aerobic metabolism study in soil under paddy field conditions (flooded).

(10) OCDE (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments. Belgirate, Itália, 18-20 de Janeiro de 1995.

(11) Guth, J.A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 123-157.

(12) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley- VCH (1998).

(13) T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residue in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945-956 (IUPAC 1984).

(14) OECD Test Guideline 304 A: Inherent Biodegradability in Soil (adoptado a 12 de Maio de 1981).

▼B

(15) ISO 10381-6 (1993). Soil Quality — Sampling — Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(16) Apêndice V à Directiva 67/548/CEE.

(17) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry. D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol 1, 85-114.

(18) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).

(19) Methods of Soil Analysis (1986). Part 1, Physical and Mineralogical Methods. A. Klute, Ed.) Agronomy Series No 9, 2.ª edição.

(20) Methods of Soil Analysis (1982). Part 2, Chemical and Microbiological Properties. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Kelney, Eds. Agronomy Series No 9, 2.ª edição.

(21) ISO Standard Compendium Environment (1994). Soil Quality — General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. Primeira Edição.

(22) Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt am Main.

(23) Scheffer, F., Schachtschabel, P. (1975). Lehrbuch der Bodenkunde. F. Enke Verlag, Stuttgart.

(24) Anderson, J.P.E., Domsch, K.H. (1978) A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. Soil Biol. Biochem. 10, 215-221.

(25) ISO 14240-1 and 2 (1997). Soil Quality — Determination of soil microbial biomass — Part 1: Substrate-induced respiration method. Part 2: fumigation-extraction method.

(26) Anderson, J.P.E. (1987). Handling and storage of soils for pesticide experiments. In Pesticide Effects on Soil Microflora. L. Somerville, M.P. Greaves, Eds. Taylor & Francis, 45-60.

(27) Kato, Yasuhiro. (1998). Mechanism of pesticide transformation in the environment: Aerobic and bio-transformation of pesticides in aqueous environment. Proceedings of the 16th Symposium on Environmental Science of Pesticide, 105-120.

(28) Keuken O., Anderson J.P.E. (1996). Influence of storage on biochemical processes in soil. In Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality, 59-63 (SETAC-Europe).

(29) Stenberg B., Johansson M., Pell M, Sjödahl-Svensson K., Stenström J., Torstensson L. (1996). Effect of freeze and cold storage of soil on microbial activities and biomass. In Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality, 68-69 (SETAC-Europe).

(30) Gennari, M., Negre, M., Ambrosoli, R. (1987). Effects of ethylene oxide on soil microbial content and some chemical characteristics. Plant and Soil 102, 197-200.

(31) Anderson, J.P.E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII, 141-146.

▼B

(32) Hamaker, J.W. (1976). The application of mathematical modelling to the soil persistence and accumulation of pesticides. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, 181-199.

(33) Goring, C.A.I., Laskowski, D.A., Hamaker, J.W., Meikle, R.W. (1975). Principies of pesticide degradation in soil. In «Environmental Dynamics of Pesticides». R. Haque and V.H. Freed, Eds., 135-172.

(34) Timme, G., Frehse, H., Laska, V. (1986). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. II. Pflanzenschutz — Nachrichten Bayer 39, 188-204.

(35) Timme, G., Frehse, H. (1980). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. I. Pflanzenschutz — Nachrichten Bayer 33, 47-60.

(36) Gustafson D.I., Holden L.R. (1990). Non-linear pesticide dissipation in soil; a new model based on spatial variability. Environm. Sci. Technol. 24, 1032-1041.

(37) Hurle K., Walker A. (1980). Persistence and its prediction. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 83-122.

▼B

Apêndice 1

TENSÃO DE ÁGUA, CAPACIDADE DE CAMPO (FC) E CAPACIDADE DE RETENÇÃO DE ÁGUA (WHC) ([1]) 1)

Altura da Coluna de Água [cm]	pF ([a])	bar ([b])	Observações
10^7	7	10^4	Solo seco
$1,6 . 10^4$	4,2	16	Ponto de emurchecimento
10^4	4	10	
10^3 .	3	1	
$6 . 10^2$	2,8	0,6	
$3,3 . 10^2$	2,5	0,33 ([c])	
10^2	2	0,1	Gama de
60	1,8	0,06	Capacidade de campo ([d])
33	1,5	0,033	
10	1	0,01	WHC (aproximação)
1	0	0,001	Solo saturado de água

([a]) pF = log da altura da coluna de água, em centímetros.
([b]) 1 bar=10^5Pa.
([c]) Corresponde a um teor de água aproximado de 10 % na areia, 35 % no limo e 45 % na argila.
([d]) A capacidade de campo não é constante, variando com o tipo de solo, com valores de pF entre 1,5 e 2,5.

A tensão de água é medida em centímetros da coluna de água ou em bar. Devido à extensa gama de valores para a tensão de sucção, esta é simplesmente expressa como o valor de pF que é equivalente ao logaritmo da altura da coluna de água, em centímetros.

A capacidade de campo é definida como a quantidade de água que pode ser armazenada, contra a gravidade, por um solo natural, 2 dias após um extenso período de precipitação ou após irrigação suficiente. É determinado no solo não perturbado, *in situ,* no campo. Esta medição não é, portanto, aplicável a amostras de solo processadas laboratorialmente. Os valores de FC determinados em solos processados podem apresentar amplas variâncias sistemáticas.

A capacidade de retenção de água (WHC) é determinada laboratorialmente em solos não perturbados ou em solos processados, através da saturação de uma coluna de solo com água por transporte capilar. É particularmente útil para solos processados e pode atingir valores até 30 % superiores à capacidade de campo (1). Para além disso, é mais fácil a sua determinação experimental do que a determinação de valores fiáveis de FC.

Notas

([1]) Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt am Main.

▼B

Apêndice 2

TEORES DE HUMIDADE DO SOLO (g de água por 100 g de solo seco) DE VÁRIOS TIPOS DE SOLOS PROVENIENTES DE DIFERENTES PAÍSES

Tipo de solo	País	Teor de humidade do solo a		
		WHC ([1])	pF = 1,8	pF = 2,5
Arenoso	Alemanha	28,7	8,8	3,9
Limo-arenoso	Alemanha	50,4	17,9	12,1
Limo-arenoso	Suíça	44,0	35,3	9,2
Franco-limoso	Suíça	72,8	56,6	28,4
Argilo-limoso	Brasil	69,7	38,4	27,3
Argilo-limoso	Japão	74,4	57,8	31,4
Areno-limoso	Japão	82,4	59,2	36,0
Franco-limoso	EUA	47,2	33,2	18,8
Areno-limoso	EUA	40,4	25,2	13,3

([1]) Capacidade de Retenção de Agua

▼B

Apêndice 3

Figura 1:

Exemplo de um sistema de fluxo para o estudo da transformação de produtos químicos no solo ([1]) ([2])

1: válvula de agulha

2: frasco de lavagem de gás, contendo água

3: membrana de ultrafiltração (apenas para condições estéreis), porosidade. 0,2 µm

4: balão de metabolismo do solo (coberto de água apenas para condições anaeróbias e paddy)

5: frasco com etilenoglicol para retenção de compostos orgânicos voláteis

6: frasco com ácido sulfúrico para retenção de compostos voláteis alcalinos

7, 8: frasco com hidróxido de sódio para retenção de CO_2 e outros compostos voláteis acídicos.

9: medidor de fluxo.

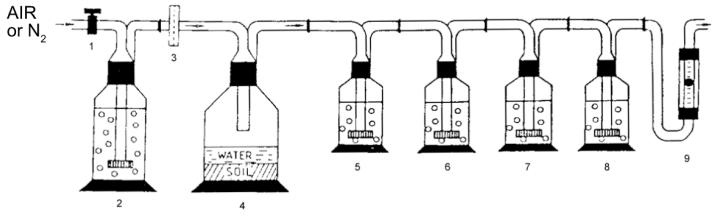
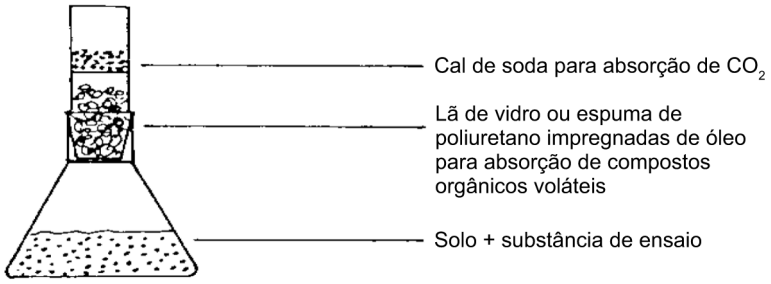


Figura 2

Exemplo de um balão biométrico para o estudo da transformação de produtos químicos no solo ([3])



([1]) Guth, J.A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 123-157.

([2]) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry. D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol 1, 85-114.

([3]) Anderson, J.P.E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII, 141-146.

▼B

C.24. TRANSFORMAÇÕES AERÓBIAS E ANAERÓBIAS EM SISTEMAS DE SEDIMENTOS AQUÁTICOS

1. MÉTODO

O presente método baseia-se na publicação OECD TG 308 (2002).

1.1. INTRODUÇÃO

Os produtos químicos podem penetrar em águas superficiais ou profundas por diversas vias, tais como aplicação directa, arrastamento, escoamento superficial, drenagem, eliminação de resíduos, efluentes industriais, domésticos ou agrícolas e deposição atmosférica. O presente Método de Ensaio descreve um método laboratorial para avaliar as transformações aeróbias e anaeróbias de produtos químicos orgânicos em sistemas de sedimentos aquáticos e baseia-se em normas de ensaio anteriormente definidas (1) (2) (3) (4) (5) (6). O número e tipo de sedimentos que devem ser utilizados no presente ensaio foi acordado numa reunião de trabalho da OCDE sobre selecção de solos e sedimentos, que decorreu em Belgirate, Itália, em 1995 (7). Foram ainda feitas recomendações relativas à recolha, manipulação e armazenamento das amostra de sedimentos, tendo como base a Orientação ISO (8). Os estudos aqui descritos são necessários para os compostos químicos utilizados na água ou que são susceptíveis de vir a atingir o ambiente aquático pelas vias supracitadas.

As condições nos sistemas de sedimentos aquáticos naturais são frequentemente aeróbias na fase aquática superior. Enquanto a camada superficial de sedimentos pode ser aeróbia ou anaeróbia, a camada mais profunda é usualmente anaeróbia. De modo a abranger as diferentes condições, o presente documento descreve tanto ensaios aeróbios como anaeróbios. O ensaio aeróbio simula uma coluna de água aeróbia no topo de uma camada aeróbia de sedimentos que é sustentada por um gradiente anaeróbio. O ensaio anaeróbio simula um sistema água-sedimento completamente anaeróbio. Em algumas circunstâncias poderá ser necessário utilizar condições significativamente diferentes das descritas nas presentes recomendações, por exemplo, utilizando núcleos intactos de sedimento ou sedimentos que possam ter sido expostos à substância de ensaio; nestes casos, deverão ser utilizados outros métodos disponíveis (9).

1.2. DEFINIÇÕES

Devem ser sempre utilizadas unidades do Sistema Internacional (SI).

Substância de ensaio: Qualquer substância, quer seja o composto inicial ou um produto de transformação relevante.

Produtos de transformação: Todas as substâncias resultantes de reacções de transformação bióticas ou abióticas da substância de ensaio, incluindo CO_2 e resíduos ligados.

Resíduos ligados: «resíduos ligados» representam compostos presentes no solo, planta ou animal, que, após extracção, persistem na matriz quer na forma da substância inicial quer como um dos seus metabolito(s). O método de extracção não poderá alterar substancialmente nem os próprios compostos nem a estrutura da matriz. A natureza da ligação poderá ser parcialmente determinada utilizando métodos extractivos que alterem a matriz e através de técnicas analíticas sofisticadas. Têm sido identificadas deste modo, por exemplo, ligações do tipo covalente, iónico e de absorção/adsorção, assim como encapsulação. De um modo geral, a formação de resíduos ligados reduz significativamente a bioacessibilidade e a biodisponibilidade das substâncias (10) [adaptado de IUPAC 1984 (11)].

▼B

Transformação aeróbia (oxidante): Reacções que ocorrem na presença de oxigénio molecular (12).

Transformação anaeróbia (redutora): Reacções que ocorrem na ausência de oxigénio molecular (12).

Águas naturais: São águas superficiais provenientes de charcos, rios, cursos de água, etc.

Sedimento: É uma mistura de constituintes químicos minerais e orgânicos, em que os últimos incluem compostos com elevado conteúdo de carbono e azoto e de peso molecular elevado. É depositado por águas naturais, com as quais forma uma interface.

Mineralização: Degradação completa de um composto orgânico em CO_2 e H_2O, em condições aeróbias, ou em CH_4, CO_2 e H_2O, em condições anaeróbias. No contexto do presente método de ensaio, quando se utiliza um composto marcado radioactivamente, o termo mineralização refere-se à sua degradação extensa, envolvendo a oxidação ou redução de um átomo de carbono marcado e a libertação da quantidade correspondente de $^{14}CO_2$ ou $^{14}CH_4$, respectivamente.

Semivida: $t_{0,5}$, é o tempo necessário para a transformação de 50 % da substância de ensaio, nos casos em que a transformação pode ser descrita por uma cinética de primeira ordem. A semivida da substância é independente da sua concentração inicial.

DT_{50} (Tempo de Desaparecimento 50): Tempo necessário para reduzir a concentração inicial da substância de ensaio em 50 %.

DT_{75} (Tempo de Desaparecimento 75): Tempo necessário para reduzir a concentração inicial da substância de ensaio em 75 %.

DT_{90} (Tempo de Desaparecimento 90): Tempo necessário para reduzir a concentração inicial da substância de ensaio em 90 %.

1.3. SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

A identificação e quantificação dos produtos de transformação através de métodos espectroscópicos e cromatográficos deverão envolver a utilização de substâncias de referência.

1.4. INFORMAÇÃO SOBRE A SUBSTÂNCIA DE ENSAIO

Embora possam ser utilizadas para a medição da taxa de transformação substâncias de ensaio marcadas isotopicamente ou não marcadas, é de preferir a utilização de material marcado. Para o estudo da via de transformação e para o estabelecimento do balanço de massa, é obrigatória a utilização de compostos marcados. A marcação recomendada é com ^{14}C, embora a utilização de outros isótopos, tais como ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H e ^{32}P, possa igualmente revelar-se útil. A marcação deve ser feita, tanto quanto possível, na(s) zona(s) mais estável(eis) da molécula ([1]). A pureza química e/ou radioquímica da substância de ensaio deve ser de, pelo menos, 95 %.

Antes de se efectuar um ensaio, deve estar disponível a seguinte informação sobre a substância de ensaio:

(a) solubilidade em água (Método A.6);

(b) solubilidade em solventes orgânicos;

(c) pressão de vapor (Método A.4) e constante da Lei de Henry;

([1]) Por exemplo, se a estrutura da substância de ensaio inclui um anel, este deverá ser marcado; no caso de a substância de ensaio possuir dois ou mais anéis, poderá ser necessário efectuar estudos independentes de modo a avaliar o destino de cada um dos anéis marcados e obter informação adequada sobre a formação dos produtos de transformação.

▼B

(d) coeficiente de partição n-octanol/água (Método A.8);

(e) coeficiente de adsorção (K_d, K_f ou K_{oc}, quando apropriado) (Método C.18);

(f) hidrólise (Método C.7);

(g) constante de dissociação (pK_a) [Norma de Ensaio OCDE 112] (13);

(h) estrutura química da substância de ensaio e, quando aplicável, posição da(s) marcação(ões) isotópica(s).

Nota: A temperatura a que se efectuaram estas medições deverá ser indicada no relatório.

Outras informações poderão ser úteis, como, por exemplo, a existência de dados relativos à toxicidade da substância de ensaio para os microorganismos, dados sobre a biodegradabilidade «fácil» e/ou inerente e dados sobre as transformações aeróbias e anaeróbias no solo.

Deverão estar disponíveis métodos analíticos (incluindo métodos de extracção e erradicação) que permitam a identificação e quantificação da substância de ensaio e dos seus produtos de transformação em água e em sedimentos (ver secção 1.7.2).

1.5. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

O método descrito no presente ensaio utiliza um sistema aeróbio e um sistema anaeróbio de sedimento aquático (ver apêndice 1) que permite:

(i) a medição da taxa de transformação da substância de ensaio num sistema água-sedimento;

(ii) a medição da taxa de transformação da substância de ensaio no sedimento;

(iii) a medição da taxa de mineralização da substância de ensaio e/ou dos seus produtos de transformação (caso se utilize a substância de ensaio marcada com C);

(iv) a identificação e quantificação dos produtos de transformação nas fases aquosa e de sedimento, incluindo balanço de massa (caso se utilize a substância de ensaio marcada);

(v) a medição da distribuição da substância de ensaio e dos seus produtos de transformação entre as duas fases durante um período de incubação no escuro (a fim de evitar, por exemplo, o desenvolvimento explosivo de algas), a temperatura constante. Nos casos em que os dados o permitam, determinam-se valores para as semividas, DT_{50}, DT_{75} e DT_{90}, não devendo estes valores ser extrapolados para muito além do período experimental (ver secção 1.2).

Tanto para os estudos aeróbios como para os estudos anaeróbios, são necessários pelo menos dois sedimentos e as respectivas águas associadas (7). No entanto, poderão existir situações em que deverão ser utilizados mais do que dois sedimentos aquáticos, como, por exemplo, no caso de um produto químico que possa estar presente em ambientes de água doce e/ou marítimos.

▼B

1.6. APLICABILIDADE DO ENSAIO

O método é geralmente aplicável a todas as substâncias químicas (não marcadas ou marcadas radioactivamente) para as quais se encontre disponível um método analítico suficientemente sensível e preciso. É aplicável a compostos ligeiramente voláteis, não voláteis, solúveis ou pouco solúveis em água. O ensaio não deve ser aplicado a compostos químicos muito voláteis a partir da água (por exemplo, fumigantes, solventes orgânicos) já que estes, nas condições experimentais descritas, não podem ser mantidos na água e/ou sedimento.

O método tem sido aplicado ao estudo das transformações sofridas por produtos químicos em águas doces e sedimentos embora, em princípio, possa ser igualmente aplicado a sistemas de estuários e marítimos. Não é, no entanto, adequado para simular as condições de águas correntes (por exemplo, rios) ou de alto mar.

1.7. CRITÉRIOS DE QUALIDADE

1.7.1. **Recuperação**

A extracção e análise de amostras de água e de sedimento, pelo menos em duplicado, imediatamente após a adição da substância de ensaio, fornece uma primeira indicação relativa à repetitividade do método analítico e à uniformidade do procedimento de aplicação da substância de ensaio. Os valores de recuperação em fases mais adiantadas das experiências são obtidos através dos respectivos balanços de massa (caso se utilize material marcado). Os valores de recuperação devem variar entre 90 % e 110 % no caso de produtos químicos marcados (6) e entre 70 % e 110 % no caso de produtos químicos não marcados.

1.7.2. **Repetitividade e sensibilidade do método analítico**

A repetitividade do método analítico (com excepção da eficiência de extracção inicial) na quantificação da substância de ensaio e dos produtos de transformação pode ser verificada pela análise, em duplicado, do mesmo extracto das amostras de água ou de sedimento, após incubação durante um período de tempo suficiente para que ocorra a formação de produtos de transformação.

O limite de detecção (LD) do método analítico, tanto para a substância de ensaio como para os produtos de transformação, deve corresponder, no mínimo, ao menor dos seguintes valores: 0,01 $mg\text{-}kg^{-1}$ de água ou sedimento (como substância de ensaio) ou 1 % da dose inicialmente aplicada ao sistema de ensaio. Deve ser igualmente especificado o limite de quantificação (LQ).

1.7.3. **Precisão dos dados de transformação**

A análise de regressão das concentrações da substância de ensaio em função do tempo fornece informação apropriada sobre a precisão da curva de transformação e permite o cálculo dos limites de confiança para as semividas (no caso de cinética de pseudo primeira ordem) ou os valores de DT_{50} e, se adequado, os valores de DT_{75} e de DT_{90}.

1.8. DESCRIÇÃO DO MÉTODO

1.8.1. **Sistema de ensaio e aparelhagem**

O estudo deve ser efectuado em recipientes de vidro (por exemplo, frascos, tubos de centrífuga), excepto se existir informação preliminar (tal como coeficientes de partição n-octanol/água, dados de absorção/adsorção, etc.) indicativa de que a substância de ensaio pode aderir ao vidro, caso em que se deve considerar a utilização de um material alternativo (como Teflon). Quando se sabe que a substância de ensaio adere ao vidro, o problema pode ser contornado através da utilização de um ou mais dos seguintes métodos:

▼B

— determinar a massa da substância de ensaio e dos produtos de transformação que se encontram absorvidos/adsorvidos ao vidro,

— efectuar uma lavagem de todo o material de vidro com solvente no final do ensaio,

— utilizar produtos formulados (ver igualmente secção 1.9.2),

— utilizar uma maior quantidade de co-solvente para a adição da substância de ensaio ao sistema. Caso se utilize um co-solvente, este não deverá provocar solvólise da substância de ensaio.

Nos apêndices 2 e 3 apresentam-se exemplos de montagens experimentais típicas de ensaio, ou seja, sistemas de fluxo e biométricos, respectivamente (14). Na referência 15 são descritos sistemas de incubação alternativos. A concepção das montagens experimentais deve permitir a troca de ar ou azoto e a retenção de produtos voláteis. As dimensões da montagem experimental devem estar de acordo com os requisitos do ensaio (ver secção 1.9.1). A ventilação pode ser obtida quer por ligeiro borbulhar, quer por passagem de ar ou azoto sobre a superfície da água. No último caso, é aconselhável agitar ligeiramente a água, a partir do topo, por forma a garantir uma melhor distribuição do oxigénio e azoto. Não deve ser utilizado ar sem CO_2, pois tal pode provocar um aumento do pH da água. Em qualquer dos casos, a perturbação do sedimento é indesejável e deve ser, tanto quanto possível, evitada. Os produtos químicos ligeiramente voláteis devem ser ensaiados num sistema biométrico com ligeira agitação da superfície da água. Podem igualmente ser utilizados recipientes fechados com um espaço livre contendo ar atmosférico ou azoto e pequenos recipientes internos para a retenção de produtos voláteis (16). Durante o ensaio aeróbio, o gás presente na zona superior livre deve ser mudado regularmente de modo a compensar o consumo de oxigénio pela biomassa.

Para a recolha de produtos de transformação voláteis, podem ser utilizados dispositivos de retenção adequados, embora não se restringindo a uma solução de hidróxido de potássio ou de hidróxido de sódio a 1 $mol.dm^{-3}$ para a retenção de dióxido de carbono ([1]) e etilenoglicol, ou etanolamina ou uma solução de parafina a 2 % em xileno para compostos orgânicos. Os produtos voláteis formados em condições anaeróbias, tais como o metano, podem ser removidos, por exemplo, através de peneiros moleculares. Estes compostos voláteis podem ser sujeitos a combustão, a CO_2, por exemplo, por passagem do gás através de um tubo de quartzo cheio com CuO a uma temperatura de 900°C e recuperando o CO_2 formado num absorvente alcalino (17).

É necessária aparelhagem laboratorial adequada à análise química da substância de ensaio e dos produtos de transformação (por exemplo, cromatografia gás-líquido (GLC), cromatografia líquida de alta resolução (HPLC), cromatografia de camada fina (TLC), espectroscopia de massa (MS), cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massa (GC-MS), cromatografia líquida acoplada a espectroscopia de massa (LC-MS), ressonância magnética nuclear (NMR), etc.), incluindo sistemas de detecção para produtos marcados radioactivamente, ou não marcados. No caso de se utilizar material marcado radioactivamente, serão ainda necessários um contador de cintilações e uma mufla de combustão oxidante (para a combustão de amostras de sedimento antes da análise de radioactividade).

Outro equipamento corrente de laboratório necessário inclui o material apropriado para determinações físico-químicas e biológicas (ver tabela 1, secção 1.8.2.2), material de vidro, produtos químicos e reagentes.

([1]) Uma vez que estas soluções alcalinas de absorção absorvem também o dióxido de carbono proveniente do ar de ventilação e da respiração em experiências aeróbias, devem ser trocadas a intervalos regulares, de modo a evitar a sua saturação e consequente perda de capacidade de absorção.

▼B

1.8.2. **Selecção e número de sedimentos aquáticos**

Os locais de amostragem devem ser seleccionados de acordo com os objectivos do ensaio para cada situação. Na sua selecção, deve ter-se em conta o historial de possíveis descargas de origem agrícola, industrial ou doméstica que tenham atingido a água no local de captação ou a montante. Não devem ser utilizados sedimentos que tenham sido contaminados com a substância de ensaio ou seus análogos estruturais nos últimos 4 anos.

1.8.2.1. Selecção de sedimento

Para os estudos aeróbios (7), utilizam-se normalmente dois sedimentos que devem diferir em relação ao teor de carbono orgânico e à textura. Um dos sedimentos deve apresentar um elevado teor de carbono orgânico (2,5 - 7,5 %) e uma textura fina, enquanto o outro deve apresentar um baixo teor de carbono orgânico (0,5 - 2,5 %) e uma textura grossa. A diferença mínima entre os teores de carbono orgânico deverá ser de 2 %. Define-se «textura fina» como um conteúdo em [argila + silte] ([1]) > 50 % e «textura grossa» como um conteúdo em [argila + silte] < 50 %. A diferença entre os conteúdos em [argila + silte] nos dois sedimentos deve ser de, pelo menos, 20 %. Nos casos em que o produto químico possa atingir águas marinhas, pelo menos um dos sistemas água-sedimento deve ser de origem marinha.

Para o estudo em condições estritamente anaeróbias, devem ser recolhidas amostras de dois sedimentos (incluindo as respectivas águas) a partir de zonas anaeróbias de massas de água superficiais (7). Tanto a fase sedimentar como a aquosa devem ser cuidadosamente manuseadas e transportadas na ausência de oxigénio.

Para a selecção dos sedimentos a incluir no ensaio podem ser importantes outros parâmetros, que devem ser considerados caso a caso. Por exemplo, a gama de pH dos sedimentos será importante para a análise de produtos químicos cuja transformação e/ou absorção/adsorção possa depender do pH. A dependência da absorção/adsorção relativamente aos valores de pH pode ser indicada pelo pK_a da substância de ensaio.

1.8.2.2. Caracterização das amostras água-sedimento

Os parâmetros mais relevantes que deverão ser medidos tanto para a água como para o sedimento e incluídos no relatório (fazendo referência ao método utilizado), assim como a fase do ensaio em que devem ser determinados, encontram-se resumidos na tabela abaixo. As referências (18) (19) (20) (21) descrevem os métodos para determinação desses parâmetros.

Em casos específicos, poderá ser necessário medir, e incluir no relatório, outros parâmetros [por exemplo, para água doce: partículas, alcalinidade, dureza, condutividade, NO_3/PO_4 (razão e valores individuais); para sedimentos: capacidade de troca catiónica, capacidade de retenção de água, carbonato, azoto e fósforo totais; para sistemas marítimos: salinidade]. Para a avaliação das condições redox, especialmente no que diz respeito à transformação anaeróbia, poderá ainda ser útil a análise dos sedimentos e da água relativamente à presença de nitrato, sulfato, ferro biodisponível e outros aceitadores electrónicos possíveis.

([1]) [Argila + silte] é a fracção mineral do sedimento com dimensão de partícula < 50 μm.

▼B

Medição de parâmetros para a caracterização das amostras água-sedimento (7) (22) (23)

Parâmetro	Fase do procedimento de ensaio					
	Amostragem de campo	Manuseamento posterior	Início da aclimatação	Início do ensaio	Durante o ensaio	Final do ensaio
Água						
Origem	X					
Temperatura	X					
PH	X		X	X	X	X
TOC			X	X		X
Concentração de O_2 (*)	X		X	X	X	X
Potencial redox (*)			X	X	X	X
Sedimento						
Origem	X					
Profundidade da camada	X					
PH		X	X	X	X	X
Distribuição do tamanho das partículas		X				
TOC		X	X	X		X
Biomassa microbiana (**)		X		X		X
Potencial redox (*)	Observação (cor/cheiro)		X	X	X	X

(*) Investigações recentes revelaram que as medições das concentrações de oxigénio e de potenciais redox na água não possuem valor mecanístico nem preditivo relativamente ao crescimento e desenvolvimento de populações microbianas em águas superficiais (24)(25). A determinação da carência bioquímica de oxigénio (BOD, durante a amostragem de campo, no início e no final do ensaio) e das concentrações dos micro/macronutrientes Ca, Mg e Mn (no início e no final do ensaio), para o caso da água, e a medição do N e P totais no caso de sedimentos (durante a amostragem de campo e no final do ensaio) podem constituir instrumentos mais úteis para a interpretação e avaliação das taxas e vias de biotransformação aeróbia.

(**) Métodos utilizados: Para estudos aeróbios, o método da taxa de respiração microbiana (26); método de fumigação (27) ou contagem de colónias (por exemplo, bactérias, actinomicetes, fungos e colónias totais). Para estudos anaeróbios, taxa de metanogénese.

1.8.3. **Recolha, manuseamento e armazenamento**

1.8.3.1. *Recolha*

Para a amostragem de sedimento, deve ser utilizada a versão preliminar da Orientação ISO para a amostragem de sedimentos (8). As amostras de sedimento recolhidas devem incluir toda a camada superior (5 cm a 10 cm) do sedimento. A água associada deve ser recolhida da mesma zona ou local e ao mesmo tempo que o sedimento. Para o estudo anaeróbio, o sedimento e a água associada devem ser recolhidos e transportados na ausência de oxigénio (28) (ver secção 1.8.2.1). Encontram-se descritos na literatura alguns dispositivos de amostragem (8) (23).

▼B

1.8.3.2. *Manuseamento*

A separação do sedimento da água é feita por filtração e o sedimento húmido é crivado com um peneiro de 2 mm, utilizando um excesso de água recolhida no mesmo local que é posteriormente rejeitada. Em seguida, misturam-se quantidades conhecidas de sedimento e água, na razão desejada (ver secção 1.9.1), em balões de incubação e preparam-se para o período de aclimatação (ver secção 1.8.4). Para o estudo anaeróbio, todos os passos devem ser realizados na ausência de oxigénio (29) (30) (31) (32) (33).

1.8.3.3. *Armazenamento*

A utilização de amostras de sedimento e água recentemente recolhidas é vivamente recomendada. No entanto, caso o seu armazenamento seja necessário, o sedimento e a água devem ser crivados, tal como descrito anteriormente, e armazenados conjuntamente, com o sedimento coberto de água (camada de água de 6 cm a 10 cm), no escuro, a 4 ± 2 °C ([1]) por um período máximo de 4 semanas (7) (8) (23). As amostras que se destinam a estudos aeróbios devem ser armazenadas em condições de boa ventilação (por exemplo, em recipientes abertos), enquanto as amostras destinadas a estudos anaeróbios devem ser armazenadas na ausência de oxigénio. Durante o transporte e o armazenamento não poderá verificar-se o congelamento do sedimento e da água ou a secagem do sedimento.

1.8.4. **Preparação das amostras de sedimento/água para o ensaio**

Cada amostra de sedimento/água deverá ser sujeita a um período de aclimatação, antes da adição da substância de ensaio. Para tal, cada amostra é colocada no recipiente de incubação que será utilizado no ensaio principal, exactamente nas mesmas condições de incubação do ensaio (ver secção 1.9.1). O período de aclimatação decorrerá durante o tempo necessário para atingir uma estabilidade razoável do sistema, reflectido pelos valores de pH, concentração de oxigénio na água, potencial redox do sedimento e da água e separação macroscópica das fases. O período de aclimatação deverá ser, geralmente, de uma a duas semanas, não devendo exceder quatro semanas. Os resultados das determinações efectuadas durante este período devem ser incluídos no relatório.

1.9. PROCEDIMENTO DO ENSAIO

1.9.1. **Condições do ensaio:**

O ensaio deve ser efectuado num aparelho de incubação (ver secção 1.8.1), com uma razão volume de água/sedimento entre 3:1 e 4:1 e uma espessura da camada de sedimento de 2,5 cm (± 0,5 cm).[2] Recomenda-se ter um mínimo de 50 g de sedimento (peso seco) por recipiente de incubação.

O ensaio deve ser efectuado no escuro, a uma temperatura constante compreendida entre 10 e 30 °C. Considera-se adequada uma temperatura de (20 ± 2) °C. Nos casos em que tal for apropriado, dependendo da informação pretendida com o ensaio, poderá considerar-se a utilização de uma temperatura mais baixa (por exemplo, 10 °C). A temperatura de incubação deverá ser sempre monitorizada e indicada no relatório.

([1]) Estudos recentes demonstraram que o armazenamento a 4 °C pode conduzir a uma diminuição do teor de carbono orgânico do sedimento que, por sua vez, poderá resultar numa diminuição da actividade microbiana (34).

▼B

1.9.2. **Tratamento e aplicação da substância de ensaio**

O ensaio é realizado com uma única concentração do produto químico ([1]). No caso de produtos químicos de protecção de colheitas aplicados directamente em massas de água, a dosagem máxima indicada no rótulo deve ser considerada como a taxa máxima de aplicação calculada com base na área superficial de água do recipiente de ensaio. Em todos os restantes casos, a concentração a utilizar deverá basear-se em previsões de emissões ambientais. Devem adoptar-se precauções que garantam a aplicação de uma concentração adequada da substância de ensaio, de modo a permitir a caracterização da via de transformação e da formação e desaparecimento dos produtos de transformação. Nos casos em que, no início do estudo, as concentrações da substância de ensaio se encontram próximas dos limites de detecção e/ou nos casos em que os principais produtos de transformação não podem ser facilmente detectados quando a sua concentração é de 10 % da taxa de aplicação da substância de ensaio, poderá ser necessária a aplicação de doses mais elevadas (por exemplo, 10 vezes superiores). No entanto, caso se utilizem no ensaio concentrações superiores, estas não deverão ter efeitos adversos significativos na actividade microbiana do sistema água-sedimento. A fim de obter uma concentração constante da substância de ensaio em recipientes de diferentes dimensões, poderá considerar-se apropriado ajustar a quantidade da substância de ensaio ao volume em ensaio; neste caso, os cálculos deverão basear-se na relação entre a profundidade da coluna de água no recipiente e a profundidade da água no campo (que se assume como sendo de 100 cm, apesar de poderem ser utilizados outros valores). Ver um exemplo de cálculo no apêndice 4.

Idealmente, a substância de ensaio deve ser adicionada à fase aquosa do sistema de ensaio na forma de solução aquosa. No entanto, quando tal for inevitável, poderão utilizar-se pequenas quantidades de solventes miscíveis em água (tais como acetona, etanol) para a aplicação e distribuição da substância de ensaio, desde que a sua concentração não exceda 1 % v/v nem provoque efeitos adversos na actividade microbiana do sistema de ensaio. Durante a preparação da solução aquosa da substância de ensaio devem tomar-se as precauções necessárias e de modo a assegurar a sua completa homogeneidade poderá ser necessário utilizar colunas e pré-mistura. Após a adição da solução aquosa ao sistema de ensaio, a fase aquosa deverá ser suavemente misturada, evitando, tanto quanto possível, perturbar o sedimento.

Embora a utilização rotineira de produtos formulados não seja recomendada, já que os ingredientes da formulação podem afectar a distribuição da substância de ensaio e/ou dos produtos de transformação entre as fases aquosa e sedimentar, no caso de substâncias de ensaio pouco solúveis em água, a sua utilização poderá constituir uma alternativa apropriada.

O número de recipientes de incubação depende do número de pontos de amostragem (ver secção 1.9.3), devendo ser incluídos sistemas de ensaio suficientes para permitir a utilização de dois sistemas em cada ponto de amostragem. Nos casos em que se utilizem unidades de controlo para cada sistema de sedimento aquático, estas não deverão ser tratadas com a substância de ensaio. As unidades de controlo poderão ser utilizadas para a determinação da biomassa microbiana do sedimento e do carbono orgânico total da água e do sedimento no final do estudo. Duas das unidades de controlo (ou seja, uma unidade de controlo de cada sedimento aquático) poderão ser utilizadas para monitorizar os parâmetros requeridos, relativamente ao sedimento e à água, durante o período de aclimatação (ver tabela na secção 1.8.2.2). No caso de a aplicação da substância de ensaio envolver a utilização de um solvente, deverão ser incluídas duas unidades de controlo adicionais para a medição dos potenciais efeitos adversos do solvente na actividade microbiana do sistema de ensaio.

([1]) O ensaio com uma segunda concentração poderá ser útil no caso de produtos químicos que atingem águas superficiais por diferentes vias de entrada, resultando em concentrações significativamente diferentes; nestes casos, é necessário garantir que a concentração mais baixa pode ser analisada com precisão suficiente.

▼B

1.9.3. Normalmente, a duração da experiência não deve exceder 100 dias (6), e deve prosseguir até que se encontrem estabelecidas as vias de degradação e os perfis de distribuição água/sedimento ou até que 90 % da substância de ensaio se tenha dissipado por transformação e/ou volatilização. Deverão ser incluídos, pelo menos, seis pontos de amostragem (incluindo a amostragem no tempo zero). A duração e o regime de amostragem apropriados para o ensaio poderão ser estabelecidos através da realização de um estudo preliminar opcional (ver secção 1.9.4) ou, no caso de existirem, a partir de dados disponíveis sobre a substância de ensaio provenientes de estudos anteriores. No caso de substâncias de ensaio hidrófobas, poderá ser necessária a inclusão de pontos de amostragem adicionais durante o período inicial do estudo, de modo a permitir a determinação da taxa de distribuição entre as fases aquosa e sedimentar.

No tempo correspondente a cada ponto de amostragem, obtêm-se, para análise, recipientes de incubação em duplicado. O sedimento e a fase aquosa sobrenadante são analisados separadamente ([1]). A água superficial deve ser removida cuidadosamente, tendo o cuidado de causar a mínima perturbação possível na fase sedimentar. A extracção e caracterização da substância de ensaio e dos seus produtos de transformação devem ser feitas recorrendo a procedimentos analíticos apropriados. O material que possa ter ficado adsorvido, quer no recipiente de incubação quer nos tubos de ligação aos dispositivos de retenção de substâncias voláteis, deve ser removido.

1.9.4. **Ensaio preliminar opcional**

Nos casos em que a duração e o regime de amostragem não possam ser estimados a partir de outros estudos relevantes sobre a substância de ensaio, pode ser considerado apropriado recorrer a um ensaio preliminar, opcional, que deverá ser efectuado utilizando as mesmas condições experimentais propostas para o estudo definitivo. Caso seja efectuado o ensaio preliminar, as condições experimentais mais relevantes e os resultados devem ser incluídos, de uma forma resumida, no relatório.

1.9.5. **Medições e análise**

A concentração da substância de ensaio e dos seus produtos de transformação na água e no sedimento, em cada ponto de amostragem, deve ser medida e incluída no relatório (expressa em concentração e em percentagem de substância aplicada). De uma forma geral, e a menos que seja apresentada uma justificação razoável para o contrário, devem ser identificados todos os produtos de transformação que sejam detectados em quantidade ≥ 10 % da radioactividade aplicada no sistema água-sedimento total, em qualquer ponto de amostragem. Os produtos de transformação cujas concentrações aumentarem continuamente durante o ensaio também devem ser identificados, mesmo nos casos em que a sua concentração não exceda os limites apresentados acima, já que este comportamento poderá ser indicativo de persistência. Esta área deve ser considerada caso a caso e o procedimento adoptado deve ser justificado no relatório.

Os resultados obtidos a partir dos sistemas de retenção de gases/compostos voláteis (CO_2 e outros compostos químicos, ou seja, compostos orgânicos voláteis) devem ser incluídos no relatório para cada um dos tempos de amostragem. As taxas de mineralização deverão igualmente ser incluídas no relatório, assim como os dados sobre os resíduos não extractáveis (ligados) para cada ponto de amostragem.

([1]) Nos casos em que os produtos de transformação anaeróbia possam ser fácil e rapidamente reoxidados, as condições anaeróbias devem ser mantidas durante a amostragem e a análise.

▼B

2. **DADOS**

2.1. TRATAMENTO DOS RESULTADOS

Para cada ponto de amostragem, deverá ser calculado o balanço de massa total ou a recuperação da radioactividade adicionada (ver secção 1.7.1). Os resultados devem ser expressos, no relatório, como percentagem da radioactividade adicionada. A distribuição da radioactividade entre a água e o sedimento deve ser apresentada no relatório, para cada tempo de amostragem, na forma de concentrações e de percentagens.

Devem calcular-se os valores de semivida, DT_{50} e, se apropriado, DT_{75} e DT_{90} da substância de ensaio, e respectivos limites de confiança (ver secção 1.7.3). A informação relativa à taxa de dissipação da substância de ensaio em água e no sedimento poderá ser obtida através da utilização de métodos de avaliação adequados, que podem ir desde a aplicação de um modelo de cinética de pseudoprimeira ordem a técnicas empíricas de ajuste de curvas, que aplicam soluções gráficas ou numéricas, e avaliações mais complexas que utilizem, por exemplo, modelos de compartimento único ou compartimentos múltiplos. Para informação mais pormenorizada poderá consultar-se a literatura relevante (35) (36) (37).

Todos os métodos disponíveis apresentam vantagens e desvantagens e grande variabilidade em termos de complexidade. Se, por um lado, o pressuposto de uma cinética de primeira ordem pode ser uma simplificação excessiva dos processos de degradação e de distribuição, a sua aplicação, quando possível, fornece um termo (constante de velocidade ou semivida) que é facilmente compreendido e bastante útil em modelação por simulação e no cálculo de concentrações ambientais previstas. A aplicação de métodos empíricos ou de modelos de transformação linear pode resultar num melhor ajuste da curva aos dados experimentais e, portanto, permitir uma melhor estimativa dos valores de semivida, DT_{50} e, quando apropriado, DT_{75} e DT_{90}. No entanto, a utilização das constantes assim derivadas é limitada. Por seu lado, a aplicação de modelos de compartimentos permite o cálculo de várias constantes úteis na avaliação de risco, que caracterizam a taxa de degradação nos diferentes compartimentos, bem como a distribuição do produto químico. Estes modelos devem igualmente ser utilizados para estimar as constantes de velocidade para a formação e degradação dos produtos de transformação principais. Em qualquer dos casos, a selecção do método adoptado deve ser justificada no relatório e o experimentador deve demonstrar graficamente e/ou estatisticamente a adequação do ajuste.

3. **RELATÓRIO**

3.1. RELATÓRIO DO ENSAIO

O relatório deve incluir a seguinte informação:

Substância de ensaio:

— nome vulgar, nome químico, número CAS, fórmula estrutural (com indicação da posição de marcação no caso da utilização de material marcado radioactivamente) e propriedades físico-químicas relevantes,

— pureza (impurezas) da substância de ensaio,

— pureza radioquímica do produto químico marcado e actividade molar (quando apropriado).

▼B

Substância de referência:

— nome químico e estrutura das substâncias de referência utilizadas para a caracterização e/ou identificação dos produtos de transformação.

Sedimentos e águas utilizados no ensaio:

— localização e descrição do local de recolha das amostras de sedimento aquático, incluindo, se possível, o historial de contaminação,

— toda a informação relacionada com a recolha, armazenamento (caso tenha sido efectuado) e aclimatação dos sistemas água-sedimento,

— características das amostras de água -sedimento, tal como apresentadas na tabela da secção 1.8.2.2.

Condições do ensaio:

— sistema de ensaio utilizado (por exemplo, sistema de fluxo, sistema biométrico, modo de ventilação, método de agitação, volume de água, massa de sedimento, espessura da camada de água e da camada de sedimento, dimensão dos recipientes de ensaio, etc.),

— aplicação da substância de ensaio ao sistema de ensaio: concentração de ensaio utilizada, número de repetições (duplicados) e controlos e modo de aplicação da substância de ensaio (por exemplo, utilização de solvente, caso necessário), etc.,

— temperatura de incubação,

— tempos de amostragem,

— métodos de extracção e respectivas eficiências, assim como métodos analíticos e limites de detecção,

— métodos para caracterização/identificação dos produtos de transformação,

— deviations from the test protocol or test conditions during the study.

Results:

— raw data figures of representative analyses (all raw data have to be stored in the GLP-archive);

— repeatability and sensitivity of the analytical methods used;

— rates of recovery (% values for a valid study are given in section 1.7.1);

— tables of results expressed as % of the applied dose and in $mg \cdot kg^{-1}$ in water, sediment and total system (% only) for the test substance and, if appropriate, for transformation products and non-extractable radioactivity;

— mass balance during and at the end of the studies;

— a graphical representation of the transformation in the water and sediment fractions and in total system (including mineralisation);

— mineralisation rates;

▼B

— half-life, DT_{50} and, if appropriate, DT_{75} and DT_{90} values for the test substance and, where appropriate, for major transformation products including confidence limits in water, sediment and in total system;

— an assessment of the transformation kinetics of the test substance and, where appropriate, the major transformation products;

— a proposed pathway of transformation, where appropriate;

— discussion of results.

4. **REFERENCES**

(1) BBA-Guidelines for the examination of plant protectors in the registration process. (1990). Part IV, Section 5-1: Degradability and fate of plant protectors in the water/sediment system. Germany.

(2) Commission for registration of pesticides: Application for registration of a pesticide. (1991). Part G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air, Section G.2.1 (a). The Netherlands.

(3) MAFF Pesticides Safety Directorate. (1992). Preliminary guideline for the conduct of biodegradability tests on pesticides in natural sediment/water systems. Ref No SC 9046. United-Kingdom.

(4) Agriculture Canada: Environmental chemistry and fate. (1987). Guidelines for registration of pesticides in Canada. Aquatic (Laboratory) — Anaerobic and aerobic. Canada. pp 35-37.

(5) US-EPA: Pesticide assessment guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental fate (1982). Section 162-3, Anaerobic aquatic metabolism.

(6) SETAC-Europe publication. (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides. Ed. Dr Mark R. Lynch. SETAC-Europe, Brussels.

(7) OECD Test Guidelines Programme. (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.

(8) ISO/DIS 5667-12. (1994). Water quality — Sampling — Part 12: Guidance on sampling of bottom sediments.

(9) US-EPA (1998a). Sediment/water microcosm biodegradation test. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3180). EPA 712-C-98-080.

(10) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley-VCH (1998).

(11) T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residues in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945-956 (IUPAC 1984).

(12) OECD Test Guideline 304A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981).

(13) OECD (1993): Guidelines for Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994-2000): Addenda 6-11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.

(14) Scholz, K., Fritz R., Anderson C. and Spiteller M. (1988) Degradation of pesticides in an aquatic model ecosystem. BCPC — Pests and Diseases, 3B-4, 149-158.

▼B

(15) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry (D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds.), Vol. 1, 85-114. J. Wiley & Sons.

(16) Madsen, T., Kristensen, P. (1997). Effects of bacterial inoculation and non-ionic surfactants on degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. Environ. Toxicol. Chem. 16, 631--637.

(17) Steber, J., Wierich, P. (1987). The anaerobic degradation of detergent range fatty alcohol ethoxylates. Studies with ^{14}C-labelled model surfactants. Water Research 21, 661-667.

(18) Black, C.A. (1965). Methods of Soil Analysis. Agronomy Monograph No. 9. American Society of Agronomy, Madison.

(19) APHA (1989). Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (17th edition). American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation, Washington D.C.

(20) Rowell, D.L. (1994). Soil Science Methods and Applications. Longman.

(21) Light, T.S. (1972). Standard solution for redox potential measurements. Anal. Chemistry 44, 1038-1039.

(22) SETAC-Europe publication (1991). Guidance document on testing procedures for pesticides in freshwater mesocosms. From the Workshop «A Meeting of Experts on Guidelines for Static Field Mesocosms Tests», 3-4 July 1991.

(23) SETAC-Europe publication. (1993). Guidance document on sediment toxicity tests and bioassays for freshwater and marine environments. From the Workshop On Sediment Toxicity Assessment (WOSTA), 8-10 November 1993. Eds.: I.R. Hill, P. Matthiessen and F. Heimbach.

(24) Vink, J.P.M., van der Zee, S.E.A.T.M. (1997). Pesticide biotransformation in surface waters: multivariate analyses of environmental factors at field sites. Water Research 31, 2858-2868.

(25) Vink, J.P.M., Schraa, G., van der Zee, S.E.A.T.M. (1999). Nutrient effects on microbial transformation of pesticides in nitrifying waters. Environ. Toxicol, 329-338.

(26) Anderson, T.H., Domsch, K.H. (1985). Maintenance carbon requirements of actively-metabolising microbial populations under *in-situ* conditions. Soil Biol. Biochem. 17, 197-203.

(27) ISO-14240-2. (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 2: Fumigation-extraction method.

(28) Beelen, P. Van and F. Van Keulen. (1990), The Kinetics of the Degradation of Chloroform and Benzene in Anaerobic Sediment from the River Rhine. Hydrobiol. Bull. 24 (1), 13-21.

(29) Shelton, D.R. and Tiedje, J.M. (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential. App. Environ. Microbiol. 47, 850-857.

(30) Birch, R.R., Biver, C., Campagna, R., Gledhill, W.E., Pagga, U., Steber, J., Reust, H. and Bontinck, W.J. (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19, 1527-1550.

(31) Pagga, U. and Beimborn, D.B. (1993). Anaerobic biodegradation tests for organic compounds. Chemoshpere 27, 1499-1509.

▼B

(32) Nuck, B.A. and Federle, T.W. (1986). A batch test for assessing the mineralisation of ^{14}C-radiolabelled compounds under realistic anaerobic conditions. Environ. Sci. Technol. 30, 3597-3603.

(33) US-EPA (1998b). Anaerobic biodegradability of organic chemicals. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3400). EPA 712--C-98-090.

(34) Sijm, Haller and Schrap (1997). Influence of storage on sediment characteristics and drying sediment on sorption coefficients of organic contaminants. Bulletin Environ. Contam. Toxicol. 58, 961-968.

(35) Timme, G., Frehse H. and Laska V. (1986) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues II. Pflanzenschutz — Nachrichten Bayer, 39, 187-203.

(36) Timme, G., Frehse, H. (1980) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues I. Pflanzenschutz — Nachrichten Bayer, 33, 47-60.

(37) Carlton, R.R. and Allen, R. (1994). The use of a compartment model for evaluating the fate of pesticides in sediment/water systems. Brighton Crop Protection Conference — Pest and Diseases, pp 1349-1354.

▼B

Annex 1

GUIDANCE ON THE AEROBIC AND THE ANAEROBIC TEST SYSTEMS

Aerobic test system

The aerobic test system described in this test method consists of an aerobic water layer (typical oxygen concentrations range from 7 to 10 $mg \cdot l^{-1}$) and a sediment layer, aerobic at the surface and anaerobic below the surface (typical average redox potentials (E_h) in the anaerobic zone of the sediment range from –80 to –190 mV). Moistened air is passed over the surface of the water in each incubation unit to maintain sufficient oxigen in the head space.

Anaerobic test system

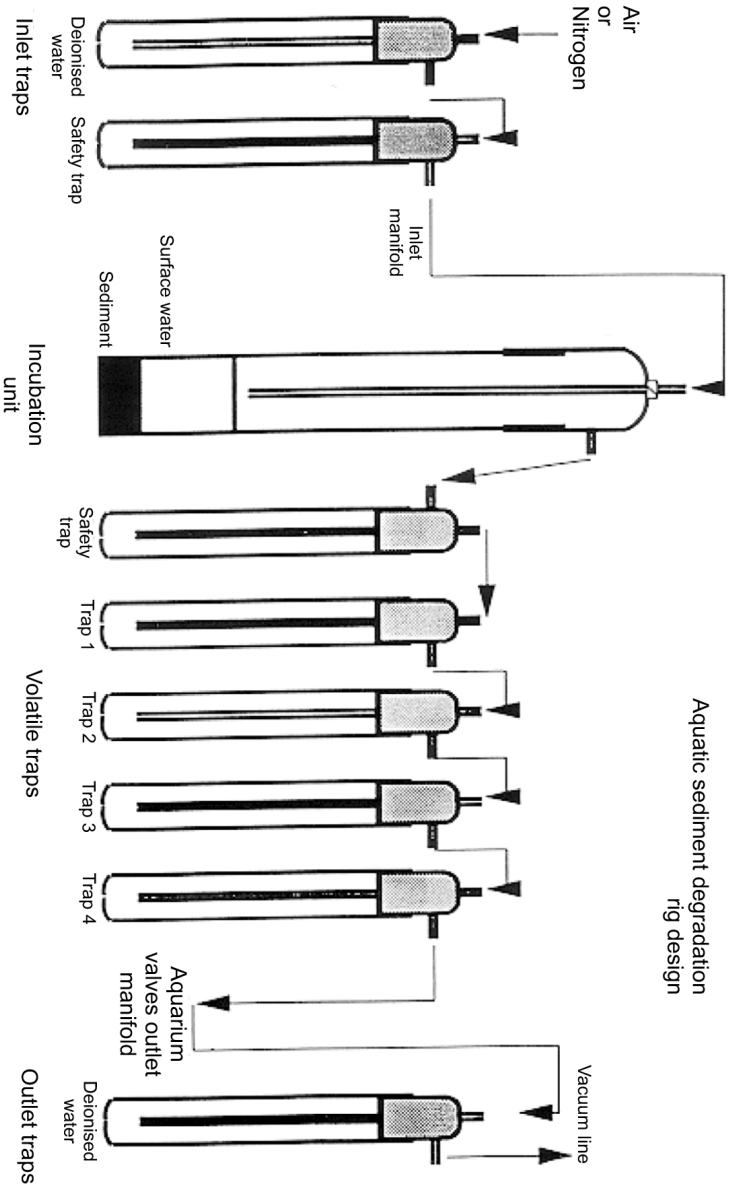
For the anaerobic test system, the test procedure is essentially the same as that outlined for the aerobic system with the exception that moistened nitrogen is passed above the surface of the water in each incubation unit to maintain a head space of nitrogen. The sediment and water are regarded as anaerobic once the redox potential (E_h) is lower than –100 mV.

In the anaerobic test, assessment of mineralisation includes measurement of evolved carbon dioxide and methane.

▼B

Annex 2

EXAMPLE OF A GAS FLOW-THROUGH APPARATUS

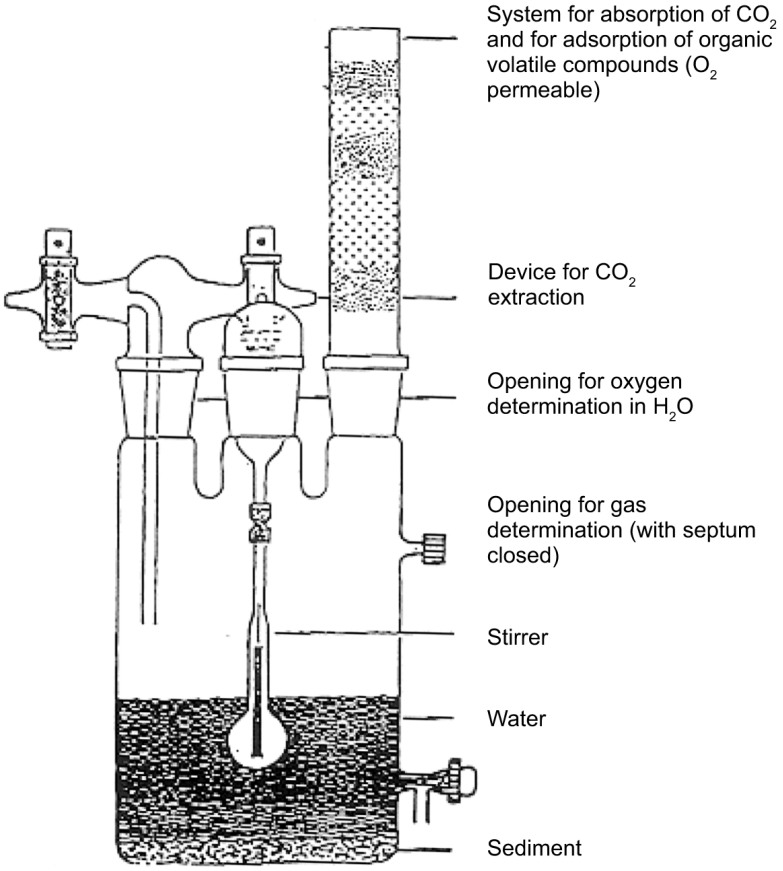


Safety trap, empty
Trap 1:
ethyleneglycol to trap organic volatiles
Trap 2:
sulphuric acid 0.1 M to trap alkaline volatiles
Traps 3 & 4:
sodium hydroxide 2 M to trap CO_2 and other acidic volatiles

▼B

Annex 3

EXAMPLE OF A BIOMETER APPARATUS



▼B

ANNEX 4

EXAMPLE CALCULATION FOR APPLICATION DOSE TO TEST VESSELS

Cylinder internal diameter:	= 8 cm
Water column depth not including sediment:	= 12 cm
Surface area: 3,142 x 4^2	= 50,3 cm^2
Application rate: 500 g test substance/ha corresponds to 5 µg/cm^2	
Total µg: 5 x 50,3	= 251,5 µg
Adjust quantity in relation to a depth of 100 cm: 12 x 251,5 ÷ 100	= 30,18 µg
Volume of water column: 50,3 x 12	= 603 ml
Concentration in water: 30,18 ÷ 603	= 0,050 µg/ml or 50 µg/l

▼M1

C.25. MINERALIZAÇÃO AERÓBICA EM ÁGUAS DE SUPERFÍCIE — ENSAIO DE SIMULAÇÃO DE BIODEGRADAÇÃO

1. MÉTODO

Este método é equivalente ao OCDE TG 309 (2004) (1).

1.1. INTRODUÇÃO

O objectivo do presente ensaio é medir a evolução da biodegradação de uma substância em estudo, a baixa concentração, em águas naturais aeróbicas, bem como quantificar as observações efectuadas sob a forma de expressões com taxas cinéticas. O presente ensaio de simulação é realizado em regime descontínuo (*batch*), em grupos de frascos colocados num agitador de laboratório, para determinação das taxas de degradação aeróbica de substâncias orgânicas em amostras de águas de superfície naturais (água doce, água salobra ou água do mar). O ensaio baseia-se na norma ISO/DIS 14592-1 (2), incluindo ainda elementos dos métodos de ensaio C.23 e C.24 (3)(4). A título facultativo, nos ensaios de longa duração, poderá ser utilizado o regime semicontínuo, em vez do regime descontínuo, para evitar a deterioração do organismo de ensaio. O principal objectivo do ensaio de simulação é determinar a mineralização da substância de ensaio nas águas superficiais, sendo essa mineralização utilizada como base para a expressão da cinética de degradação. O ensaio poderá ainda, a título facultativo e como objectivo secundário, ser utilizado para obter informação sobre a degradação primária e sobre a formação dos principais metabolitos. A identificação dos metabolitos e, quando possível, a quantificação das respectivas concentrações, são particularmente importantes para as substâncias que mineralizam de forma muito lenta (p.ex.: com uma meia-vida para o ^{14}C residual total superior a 60 dias). Devido às limitações analíticas, a identificação e quantificação dos principais metabolitos exigirá normalmente a utilização de concentrações elevadas da substância em estudo (p.ex.: > 100 µg/l).

No contexto do presente ensaio, uma baixa concentração significa uma concentração (p.ex.: de menos de 1 µg/l a 100 µg/l) suficientemente baixa para garantir que a cinética de biodegradação obtida pelo ensaio reflecte o que seria de esperar no meio natural. Por comparação com a massa total de substratos de carbono biodegradáveis disponíveis na água natural utilizada para o ensaio, a substância em estudo, presente a baixa concentração, servirá como substrato secundário, pelo que será de esperar uma cinética de biodegradação de primeira ordem (cinética de «não crescimento») com a substância em estudo a ser degradada por «co-metabolismo». Um cinética de primeira ordem implica que a taxa de degradação (mg/l/dia) é proporcional à concentração de substrato, que diminui ao longo do tempo. Numa verdadeira cinética de primeira ordem, a taxa específica constante de degradação, k, é independente do tempo e da concentração, ou seja, k não varia de forma apreciável durante o decurso de uma experiência e não se altera com as concentrações adicionadas entre as diferentes fases da mesma. Por definição, a taxa específica constante de degradação é igual à alteração relativa da concentração por unidade de tempo: $k = (1/C) \cdot (dC/dt)$. Embora seja de esperar, nas condições descritas, uma cinética de primeira ordem, poderão existir circunstâncias em que outro tipo de cinética seja mais apropriado. Podem observar-se desvios em relação a uma cinética de primeira ordem, por exemplo, no caso em que certos fenómenos de transferência de massa como a taxa de difusão, e não a taxa da reacção biológica, são o factor limitante da biotransformação No entanto, os dados quase sempre podem ser descritos por uma cinética de pseudo primeira ordem, com uma taxa constante dependente da concentração.

▼M1

A informação sobre a biodegradabilidade da substância em estudo a concentrações mais elevadas (p.ex.: a partir de ensaios-padrão de identificação), bem como sobre a degradabilidade abiótica, os metabolitos e as propriedades físico-químicas relevantes, deve estar disponível antes da realização do ensaio, de modo a permitir a planificação da experiência e a interpretação dos resultados. O estudo de substâncias marcadas com ^{14}C e a determinação da distribuição do ^{14}C pelas fases no final do ensaio permitem a determinação da biodegradabilidade global. Quando se utilizam substâncias não marcadas, a biodegradabilidade global só pode ser estimada se se proceder ao ensaio de concentrações mais elevadas e se todos os metabolitos forem conhecidos.

1.2. DEFINIÇÕES

Biodegradação primária: alteração estrutural (transformação) de uma substância química por microorganismos, resultando na perda da identidade química.

Biodegradação funcional: alteração estrutural (transformação) de uma substância química por microorganismos, resultando na perda de uma determinada propriedade.

Biodegradação aeróbica completa: desnaturação de uma substância química por microorganismos, na presença de oxigénio, de que resulta a formação de dióxido de carbono, água e sais minerais dos restantes elementos presente (mineralização) e a produção de biomassa e de produtos orgânicos de biossíntese microbiana.

Mineralização: desnaturação de uma substância química ou de matéria orgânica por microorganismos, na presença de oxigénio, de que resulta a formação de dióxido de carbono, água e sais minerais dos restantes elementos presentes.

Fase de latência: período que decorre desde o início do ensaio até à adaptação do microorganismo responsável pela degradação e ao aparecimento de um grau detectável de biodegradação (p.ex.: 10 % da biodegradação teórica máxima, ou menos, dependendo da precisão da técnica de medição) de uma substância química ou de matéria orgânica.

Nível máximo de biodegradação: nível de biodegradação de uma substância química ou matéria orgânica num ensaio, registado em percentagem, acima do qual não ocorre mais biodegradação durante o ensaio.

Substrato primário: conjunto de fontes naturais de carbono e de energia que permitem o crescimento e a sobrevivência da biomassa microbiana.

Substrato secundário: componente do substrato presente numa concentração tão baixa que a sua degradação apenas fornece aos microorganismos presentes quantidades insignificantes de carbono e de energia, quando comparadas com o carbono e energia fornecidos pela degradação dos componentes principais do substrato (substratos primários).

Taxa constante de degradação: taxa cinética constante de primeira ordem ou de pseudo- primeira ordem, k (d^{-1}), que indica a taxa dos processos de degradação. Numa experiência em modo descontínuo, k é estimado a partir da parte inicial da curva de degradação, após o final da fase de latência.

▼M1

Meia-vida, $t_{1/2}$ (d): termo utilizado para caracterizar a taxa de uma reacção de primeira ordem. É o intervalo de tempo que corresponde a uma divisão da concentração por 2. A meia-vida e a taxa constante de degradação são relacionados pela equação $t_{1/2} = \ln 2/k$.

Tempo de meia degradação, DT_{50} (d): termo utilizado para quantificar o resultado dos ensaios de biodegradação. É o período, incluindo a fase de latência, necessário para se atingir um valor de 50 % de degradação.

Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ): o limite de detecção (LOD) é a concentração de uma substância abaixo da qual a identidade da mesma não pode ser distinguida da linha de base do aparelho analítico utilizado. O limite de quantificação (LOQ) é a concentração de uma substância abaixo da qual a concentração não pode ser determinada com uma precisão aceitável.

Carbono Orgânico Dissolvido (COD): é a parte do carbono orgânico presente numa amostra de água que não pode ser removida por separação de fases, por exemplo por centrifugação a 40 000 ms^{-2} durante 15 minutos ou por filtração através de membrana com um diâmetro de poro de 0,2 μm-0,45 μm.

Actividade total ^{14}C orgânico (TOA): a actividade total do ^{14}C associado ao carbono orgânico.

Actividade ^{14}C orgânico dissolvido (DOA): a actividade total do ^{14}C associado ao carbono orgânico dissolvido.

Actividade ^{14}C orgânico particulado (POA): a actividade total do ^{14}C associado ao carbono orgânico particulado.

1.3. APLICABILIDADE DO ENSAIO

O ensaio de simulação é aplicável a substâncias orgânicas não voláteis ou pouco voláteis, ensaiadas a baixas concentrações. Utilizando frascos abertos para a atmosfera (p.ex.: tapados com rolha de lã de vidro), as substâncias com uma constante de Henry inferior a cerca de 1 $Pa•m^3/mol$ (aprox. 10^{-5} $atm•m^3/mol$) podem ser consideradas, em termos práticos, como não voláteis. Utilizando frascos fechados, com algum espaço livre na parte superior, é possível ensaiar substâncias ligeiramente voláteis (com uma constante de Henry < 100 $Pa•m^3/mol$ ou < 10^{-3} $atm•m^3/mol$) sem perdas a partir do sistema de ensaio. A perda de substâncias marcadas com ^{14}C pode ocorrer, se não se tomarem as devidas precauções, durante a purga do CO_2. Nessas situações, poderá ser necessário capturar o CO_2 num absorvente alcalino interno ou utilizar um sistema externo de absorção do CO_2 (determinação directa do $^{14}CO_2$; ver o anexo 3). Para a determinação da cinética de biodegradação, a concentração da substância em estudo deve ser inferior à sua hidrossolubilidade máxima. Cabe aqui notar, contudo, que os valores de hidrossolubilidade existentes na literatura podem ser consideravelmente mais elevados do que a solubilidade da substância em estudo em águas naturais. A título facultativo, a solubilidade de substâncias em estudo particularmente difíceis de dissolver em água poderá ser determinada utilizando as águas naturais em estudo.

O método pode ser utilizado para simular a biodegradação em águas de superfície livres de partículas grosseiras (ensaio pelágico) ou em águas de superfície turvas, como as que se podem encontrar, por exemplo, junto ao interface água/sedimento (ensaio com sedimento em suspensão).

▼M1

1.4. PRINCÍPIO DO ENSAIO

O ensaio é realizado em modo descontínuo, incubando a substância em estudo apenas com água de superfície (ensaio pelágico) ou com água de superfície com sólidos/sedimentos em suspensão numa concentração entre 0,01 e 1 g/l de peso seco (ensaio com sedimento em suspensão), para simular uma massa de água com sólidos em suspensão ou com sedimentos re-suspendidos. Uma concentração de sólidos/sedimentos na parte inferior do intervalo referido é típica na maior parte das águas superficiais. Os frascos de ensaio são incubados em ambiente escuro, à temperatura ambiente, em condições aeróbicas e com agitação. Para a determinação da cinética de degradação, devem ser utilizadas pelo menos duas concentrações da substância em estudo, diferentes entre si num factor de 5 a 10 e que devem corresponder à gama de concentrações presentes no ambiente natural. A concentração máxima da substância em estudo não deve ultrapassar os 100 μg/l, mas será preferível utilizar concentrações máximas abaixo dos 10 μg/l, de modo a garantir a biodegradação de acordo com uma cinética de primeira ordem. A concentração mais baixa não deverá exceder os 10 μg/l, mas será preferível utilizar concentrações na gama dos 1-2 μg/l ou mesmo inferiores a 1 μg/l. Normalmente, é possível proceder a uma análise adequada de concentrações dessa ordem de grandeza utilizando substâncias marcadas com ^{14}C disponíveis no comércio. Devido a limitações analíticas, a medição da concentração da substância em estudo com a precisão exigida é muitas vezes impossível, quando a concentração utilizada é ≤ 100 μg/l (ver o segundo parágrafo do ponto 1.7.2). Uma concentração mais elevada da substância em estudo (> 100 μg/l e, por vezes, > 1 mg/l) pode ser utilizada para a identificação e quantificação dos principais metabolitos ou para os casos em que não existe um método analítico específico com um limite de detecção suficientemente baixo. Quando se ensaiarem concentrações elevadas da substância em estudo, poderá não ser possível utilizar os resultados para estimar a constante de degradação de primeira ordem ou a meia-vida, já que a degradação não se fará provavelmente de acordo com uma cinética de primeira ordem.

A degradação será acompanhada a intervalos apropriados, por medição do ^{14}C residual ou da concentração residual da substância em estudo, quando se utilizar um método específico de análise química. A marcação com ^{14}C das partes mais estáveis da molécula em estudo garante a determinação da mineralização total, enquanto que a marcação com ^{14}C das partes menos estáveis da mesma molécula, tal como a utilização de um método de análise específico, só permite avaliar a biodegradação primária. No entanto, a parte mais estável não inclui necessariamente a fracção funcionalmente relevante da molécula (que pode ser relacionada com uma determinada propriedade, como a toxicidade, a bioacumulação, etc). Se for esse o caso, poderá ser melhor utilizar no estudo uma substância marcada com ^{14}C na sua parte funcional, de modo a poder acompanhar a eliminação da propriedade que lhe esteja associada.

1.5. INFORMAÇÃO SOBRE A SUBSTÂNCIA EM ESTUDO

No presente ensaio, a substância em estudo utilizada tanto pode ser marcada como não marcada. A marcação, para a qual se recomenda a técnica do ^{14}C, deve ser normalmente aplicada na(s) parte(s) mais estável(is) da molécula (ver também o ponto 1.4). No caso das substâncias com mais do que um anel aromático, deverão ser marcados, de preferência, um ou mais átomos de carbono em cada anel. Por outro lado, deverão igualmente ser marcados, de preferência com ^{14}C, um ou mais átomos de carbono em ambos os lados das ligações mais facilmente degradáveis. A pureza química e/ou radioquímica da substância em estudo deve ser > 95 %. No caso das substâncias marcadas com radioisótopos, será preferível uma actividade específica da ordem dos μCi/mg (1,85 MBq) ou mais, de modo a facilitar as medições do ^{14}C nos ensaios com baixas concentrações iniciais. Deve ser fornecida a seguinte informação em relação à substância em estudo:

▼M1

— hidrossolubilidade [método de ensaio A.6],

— solubilidade em solvente(s) orgânico(s) (substâncias aplicadas com um solvente ou de baixa hidrossolubilidade),

— constante de dissociação (pKa), nos casos em que a substância seja propensa a protonização ou desprotonização [OCED TG 112] (5),

— pressão de vapor [método de ensaio A.4] e/ou constante de Henry,

— estabilidade química na água e em ambiente escuro (hidrólise) [método C.7].

Quando se proceder ao ensaio de substâncias com baixa hidrossolubilidade em água do mar, poderá também ser útil conhecer a constante de salinização (ou «constante de Setschenow»), K^s, que é definida pela seguinte equação: log (S/S') = K^s C_m, onde S e S' representam a solubilidade da substância em água doce e salgada, respectivamente, e C_m é a concentração molar de sal.

Se o ensaio for conduzido como um «ensaio com sedimento em suspensão», deverá igualmente ser fornecida a seguinte informação:

— coeficiente de partição n-octanol/água [método de ensaio A.8],

— coeficiente de adsorção [método C.18].

Outra informação que poderá ser útil inclui:

— a concentração no ambiente natural, quando for conhecida ou puder ser estimada,

— a toxicidade da substância em estudo para o microorganismo [método C.11],

— a biodegradabilidade imediata e/ou inerente [métodos C.4 A-F, C.12, C.9, OCDE TG 302] (5),

— a biodegradabilidade aeróbica ou anaeróbica em estudos de transformação no solo ou em sedimentos/água [métodos C.23 e C.24].

1.6. SUBSTÂNCIA DE REFERÊNCIA

Uma substância, que normalmente deverá ser facilmente degradada em condições aeróbicas (p.ex.: anilina ou benzoato de sódio), deverá ser utilizada como substância de referência. O tempo previsto para a degradação da anilina ou do benzoato de sódio é normalmente inferior a 2 semanas. A substância de referência é utilizada para garantir que a actividade microbiana da água em estudo se encontra dentro de certos limites; ou seja, que a água contém uma população microbiana activa.

▼M1

1.7. CRITÉRIOS DE QUALIDADE

1.7.1. **Recuperação**

Imediatamente após a adição da substância em estudo, as concentrações iniciais de ensaio devem ser verificadas por medição da actividade do ^{14}C ou por análise química, no caso das substâncias não marcadas, em amostras pelo menos duplicadas. Essa verificação permitirá obter informação sobre a aplicabilidade e reproductividade do método analítico e ainda sobre a homogeneidade da distribuição da substância em estudo. Normalmente, o valor a utilizar posteriormente na análise dos dados será o valor inicial medido da actividade do ^{14}C ou da concentração da substância em estudo, e não a concentração nominal, o que permite eliminar os eventuais erros devido às perdas por adsorção e a erros de doseamento. No caso de uma substância marcada com ^{14}C, o nível de recuperação no final da experiência é dado pelo balanço de massas (ver o último parágrafo do ponto 1.8.9.4). Em termos ideais, o balanço de massas das substâncias marcadas com ^{14}C deve situar-se entre 90 % e 110 %, enquanto que a precisão analítica deverá resultar numa recuperação inicial de entre 70 % e 110 % para as substâncias em estudo não marcadas. Estes intervalos devem ser interpretados como um objectivo, não devendo ser utilizados como critério de aceitação do ensaio. A título facultativo, poderá ser determinada a precisão analítica para concentrações inferiores da substância em estudo e para os principais metabolitos.

1.7.2. **Reproductividade e sensibilidade do método analítico**

A reproductividade do método analítico (incluindo a eficiência da extracção inicial) em termos da quantificação da substância em estudo e, se aplicável, dos respectivos metabolitos, deverá ser verificada através de cinco análises replicadas de extractos da água de superfície.

O limite de detecção (LOD) do método analítico para a substância em estudo e para os seus metabolitos deverá ser, quando possível, pelo menos 1 % da quantidade inicial aplicada no sistema de ensaio. O limite de quantificação (LOQ) deverá ser igual ou menor do que 10 % da concentração aplicada. A análise química de muitas substância orgânicas e dos respectivos metabolitos exige frequentemente que a substância em estudo seja aplicada numa concentração relativamente elevada, ou seja, > 100 μg/l.

1.8. DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

1.8.1. **Equipamento**

O ensaio pode ser conduzido em frascos cónicos ou cilíndricos de capacidade apropriada (p.ex.: 0,5 l ou 1 l) tapados com rolhas de silicone ou de borracha, ou ainda em frascos de soro com tampas impermeáveis ao CO_2 (p.ex.: rolha de borracha butílica). Outra possibilidade será efectuar o ensaio utilizando diversos frascos para cada concentração e recolhendo, para cada amostra, um frasco inteiro, pelo menos em duplicado (ver o último parágrafo do ponto 1.8.9.1). No caso das substâncias não voláteis e não marcadas com um radioisótopo, não será necessário utilizar rolhas ou tampas impermeáveis aos gases, bastando utilizar rolhas de algodão que evitem a contaminação aérea (ver o segundo parágrafo do ponto 1.8.9.1). As substâncias ligeiramente voláteis devem ser ensaiadas num sistema de tipo biométrico, com ligeira agitação das águas de superfície em estudo. A fim de garantir a ausência de contaminação bacteriana, os frascos poderão, a título facultativo, ser esterilizados por aquecimento ou em autoclave, antes do início do ensaio. Será utilizado o seguinte equipamento de laboratório:

— mesa com agitação ou agitadores magnéticos, para agitação contínua dos frascos de ensaio,

▼M1

— centrifugadora,

— medidor de pH,

— turbidímetro para medições nefelométricas da turbidez,

— forno ou micro-ondas, para as determinações do peso seco,

— aparelho de filtração por membrana,

— autoclave ou forno para a esterilização por calor do material de vidro,

— instalações para o manuseamento de substâncias marcadas com ^{14}C,

— equipamento para quantificar a actividade do ^{14}C em amostras das soluções com o CO_2 precipitado e, se necessário, de amostras de sedimento,

— equipamento analítico para o doseamento da substância em estudo (e da substância de referência) através de análise química específica (p.ex.: cromatografia de gás, HPLC).

1.8.2. **Soluções de reserva da substância em estudo**

Utilizando água desionizada, preparam-se soluções de reserva da substância em estudo e da substância de referência (ver o primeiro parágrafo do ponto 1.8.7). A água desionizada deve estar isenta de qualquer substância que possa ser tóxica para os microorganismos e não deverá ter um teor de carbono orgânico dissolvido (COD) superior a 1 mg/l (6).

1.8.3. **Recolha e transporte da água de superfície**

O local de amostragem para a recolha da água de superfície deve ser seleccionado, independentemente da situação, de acordo com o objectivo do ensaio. Para a escolha dos locais de amostragem, deverão ser tomados em conta os eventuais efeitos da agricultura, da indústria ou das actividades domésticas. Se um determinado ambiente aquático tiver comprovadamente sido contaminado com a substância em estudo ou com outras substâncias estruturalmente análogas durante os quatro anos anteriores, não deverá ser utilizado para a recolha de amostras de água, a não ser que o investigador esteja expressamente interessado na investigação das taxas de degradação em locais previamente expostos à substância. O pH e a temperatura da água devem ser medidos no local de colheita. Devem igualmente ser registadas a profundidade a que foi feita a amostra e a aparência (p.ex.: cor e turbidez) da mesma (ver o ponto 3). A concentração de oxigénio e/ou o potencial redox da água e da camada superficial do sedimento devem ser medidos de modo a demonstrar a existência de condições aeróbicas, a não ser que essas condições sejam óbvias a julgar pela aparência e pela experiência já adquirida no local. A água de superfície deve ser transportada num recipiente cuidadosamente lavado. Durante o transporte, a temperatura da amostra não deve ultrapassar significativamente a temperatura que irá ser utilizada no ensaio. Quando a duração do transporte ultrapassar as 2 a 3 horas, recomenda-se o arrefecimento a 4° C. A amostra de água não deve ser congelada.

▼M1

1.8.4. **Armazenamento e preparação da água de superfície**

O ensaio deve, de preferência, ser iniciado no prazo de um dia a partir da colheita da amostra. O armazenamento da água, quando necessário, deve ser reduzido ao mínimo possível e não deve, em qualquer caso, ultrapassar um máximo de 4 semanas. A amostra de água deve ser conservada a 4º C, com arejamento, até ser utilizada. Antes disso, devem remover-se as partículas mais grosseiras, por exemplo por filtração através de um filtro de *nylon* com um poro de cerca de 100 μm, de papel de filtro grosso ou ainda por sedimentação.

1.8.5. **Preparação da água corrigida com o sedimento (facultativo)**

Para os ensaios com sedimento em suspensão, o sedimento superficial é acrescentado a frascos contendo água natural (filtrada para remoção das partículas mais grosseiras, como se descreve no ponto 1.8.4), de modo a obter uma suspensão; a concentração de sólidos em suspensão deve ser de 0,01 a 1 g/l. O sedimento superficial deve ser proveniente do mesmo local de onde foi recolhida a amostra de água. Dependendo do tipo de ambiente aquático em causa, o sedimento superficial poderá ser caracterizado por um teor elevado de carbono orgânico (2,5-7,6 %) e por uma textura fina ou por um baixo teor de carbono orgânico (0,5-2,5 %) e por uma textura mais grosseira (3). O sedimento superficial pode ser preparado do seguinte modo: extrair diversas amostras em profundidade do sedimento, utilizando um tubo de plástico transparente, separando as camadas superiores aeróbicas (desde a superfície até uma profundidade máxima de 5 cm) imediatamente após a amostragem e juntando-as numa só amostra. Essa amostra do sedimento deve ser transportada num recipiente com muito espaço livre, de modo a que o sedimento se mantenha em condições aeróbicas (arrefecer a 4º C se o transporte durar mais do que 2-3 horas). A amostra de sedimento deverá ser suspensa na água de ensaio numa razão de 1:10 e mantida a 4º C, com arejamento, até ao momento da utilização. O armazenamento do sedimento, quando necessário, deve ser reduzido ao mínimo possível e não deve, em qualquer caso, ultrapassar um máximo de 4 semanas.

1.8.6. **Procedimento semicontínuo (facultativo)**

Nos casos em que a fase de latência, até que seja possível medir uma degradação significativa da substância em estudo, seja longa poderá ser necessária uma incubação prolongada (diversos meses). Se essa característica já for conhecida de anteriores ensaios da substância, o ensaio poderá ser iniciado utilizando um procedimento semicontínuo, que permite a renovação periódica de parte da água ou da suspensão em estudo (ver o anexo 2). Se não for esse o caso, o ensaio normal, em modo descontínuo, poderá ser transformado num ensaio semicontínuo se não se observar nenhuma degradação da substância em estudo durante aproximadamente 60 dias de ensaio em descontínuo (ver o segundo parágrafo do ponto 1.8.8.3).

1.8.7. **Adição da substância em estudo (ou de referência)**

Para as substâncias altamente hidrossolúveis (> 1 mg/l) e pouco voláteis (constante de Henry < 1 Pa•m^3/mol ou < 10^{-5} atm•m^3/mol), poderá preparar-se uma solução de reserva em água ionizada (ver o ponto 1.8.2); essa solução deverá ser adicionada aos frascos de ensaio no volume necessário para obter a concentração pretendida. O volume de qualquer solução de reserva adicionada deverá ser limitado ao mínimo que seja prático (sempre que possível, < 10 % do volume final de líquido). Outro procedimento passa pela dissolução da substância em estudo num volume maior de água de ensaio, que poderá ser utilizada em alternativa à utilização de solventes orgânicos.

▼M1

Quando não for possível evitá-lo, as soluções de reserva de substâncias não voláteis e de fraca hidrossolubilidade podem ser preparadas com um solvente orgânico volátil, mas a quantidade adicionada desse solvente não deve exceder 1 % v/v e não deve ter qualquer efeito adverso sobre a actividade microbiana. O solvente não deverá afectar a estabilidade da substância em estudo em meio aquático. O solvente deverá ser escorrido até que só reste uma quantidade extremamente pequena, de maneira a não aumentar significativamente o COD da água ou da suspensão em estudo, factor que deverá ser verificado por análise específica da substância em causa ou, se possível, por análise do COD (6). Deve tomar-se o cuidado de limitar a quantidade de solvente transferido ao mínimo estritamente necessário, bem como de garantir que a quantidade pretendida da substância em estudo possa ser dissolvida no volume final de água previsto para o ensaio. Poderão ser utilizadas outras técnicas para a introdução da substância em estudo nos frascos de ensaio, como se descreve em (7) e (8). Quando se utilizar um solvente orgânico para a aplicação da substância em estudo, frascos de controlo do solvente com a água de ensaio (sem mais nenhuma substância adicionada) e com a água de ensaio e a substância de referência deverão ser tratados da mesma forma que os frascos de ensaio propriamente ditos, aos quais foi acrescentada a substância em estudo, dissolvida num solvente. O objectivo dos controlos do solvente é analisar a possibilidade de ocorrência de efeitos adversos causados pelo solvente sobre a população microbiana e que tenham efeitos sobre a degradação da substância de referência.

1.8.8. **Condições de ensaio**

1.8.8.1. *Temperatura de ensaio*

A incubação deve ser feita em local escuro (de preferência) ou com luz difusa e a temperatura controlada (± 2 °C), que poderá ser a temperatura de campo ou uma temperatura normalizada de 20-25º C. A temperatura de campo pode ser entendida como a temperatura real da amostra no momento da colheita ou como a temperatura média no local da recolha.

1.8.8.2. *Agitação*

Os frascos devem ser agitados ou mexidos em contínuo, para que as partículas e microorganismos se mantenham em suspensão. A agitação servirá igualmente para facilitar a transferência de oxigénio a partir do espaço livre acima do líquido, de modo a que as condições aeróbicas sejam mantidas de forma adequada. Colocar os frascos numa mesa de agitação (aproximadamente 100 rpm) ou utilizar agitação magnética. A agitação deve ser contínua, mas tão suave quanto possível, desde que permita manter uma suspensão homogénea.

1.8.8.3. *Duração do ensaio*

A duração do ensaio não deverá normalmente ultrapassar os 60 dias, a não ser que se utilize um regime de ensaio semicontínuo, com renovação periódica da suspensão de ensaio (ver o ponto 1.8.6 e o anexo 2). O período dos ensaios em descontínuo poderá, no entanto, ser alargado até um máximo de 90 dias, se a degradação da substância em estudo se tiver iniciado durante os primeiros 60 dias. A degradação será acompanhada, a intervalos apropriados, pela determinação da actividade residual do ^{14}C ou da evolução do $^{14}CO_2$ (ver o ponto 1.8.9.4) e/ou por análise química (ver o ponto 1.8.9.5). O período de incubação deve ser suficientemente longo para permitir a avaliação do processo de degradação. A degradação deverá, de preferência, ultrapassar os 50 %; no caso das substâncias de degradação lenta, a percentagem de degradação deve ser suficiente (normalmente superior a 20 %) para permitir a estimação de uma taxa constante de degradação cinética.

▼M1

O pH e a concentração de oxigénio do sistema de ensaio devem ser medidos periodicamente, a não ser quando a experiência anterior de ensaios semelhantes com amostras de água e de sedimentos recolhidos no mesmo local faça com que isso não seja necessário. Em certas condições, o metabolismo dos substratos primários presentes a concentrações muito elevadas na água ou nos sedimentos poderá eventualmente resultar numa produção de CO_2 e numa depleção do oxigénio suficientes para alterar de forma significativa as condições experimentais durante o ensaio.

1.8.9. **Procedimento**

1.8.9.1. *Preparação dos frascos para o ensaio pelágico*

Transferir um volume adequado de água de ensaio para os frascos, enchendo até cerca de um terço do volume total, pelo menos com 100 ml. Se se utilizarem diversos frascos (de forma a permitir a recolha de um frasco inteiro em cada amostra), o volume de água de ensaio mais indicado será também de cerca de 100 ml, já que a utilização de volumes menores poderá ter influência sobre a duração da fase de latência. A substância em estudo é adicionada a partir de uma solução de reserva, como se descreve nos pontos 1.8.2 e 1.8.7. Para a determinação da cinética de degradação e para o cálculo da taxa constante de degradação cinética, devem ser utilizadas pelo menos duas concentrações diferentes da substância em estudo, com um factor de concentração entre 5 e 10. Ambas as concentrações devem ser inferiores a 100 µg/l e, de preferência, estar compreendidas no intervalo entre <1 e 10 µg/l.

Fechar os frascos com rolhas ou tampas impermeáveis ao ar e ao CO_2. No caso dos ensaios de substâncias químicas não marcadas com ^{14}C e não voláteis, podem ser utilizadas simples tampas de algodão que evitem a contaminação (ver o ponto 1.8.1), desde que se saiba que os principais metabolitos também não são voláteis e que se utilize um método indirecto para a determinação do CO_2 (ver o anexo 3).

Incubar os frascos à temperatura escolhida (ver o ponto 1.8.8.1). Retirar amostras para a análise química ou para a medição do ^{14}C no início do ensaio (ou seja, antes de começar a biodegradação, ver o ponto 1.7.1) e depois a intervalos adequados durante o ensaio. A amostragem pode ser efectuada retirando subamostras (p.ex.: aliquotas de 5 ml) de cada replicado ou recolhendo um frasco inteiro em cada momento de amostra. A mineralização da substância em estudo pode ser determinada de forma directa ou indirecta (ver o anexo 3). Normalmente, uma estimativa fiável da constante de degradação exige, no mínimo, 5 pontos de amostragem durante a fase de degradação (ou seja, após o final da fase de latência), a não ser quando se possa provar que três pontos são suficientes para as substâncias de degradação rápida. Quanto às substâncias que não são rapidamente degradadas, a obtenção de mais pontos durante a fase de degradação não deve constituir nenhuma dificuldade, pelo que se deverão utilizar mais pontos de amostragem para a estimativa de k. Não é possível indicar nenhum calendário fixo de amostragem, dada a variação das taxas de biodegradação; no entanto a recomendação, nos casos em que a degradação seja lenta, é que se efectuem amostras uma vez por semana. Se a substância em estudo se degradar rapidamente, deve ser feita uma amostra por dia durante os primeiros três dias e, depois disso, uma amostra a cada dois ou três dias. Em determinadas circunstâncias, como por exemplo substâncias de hidrólise rápida, poderá ser necessário proceder a uma amostragem de hora a hora. Recomenda-se a realização de um estudo prévio ao ensaio, de modo a determinar o intervalo de amostragem mais adequado. Se as amostras tiverem de ser conservadas para posterior realização de análises específicas, será aconselhável retirar um número maior de amostras e depois, no final do estudo, seleccionar as que serão analisadas de trás para a frente, ou seja, analisando primeiro as últimas amostras (ver o segundo parágrafo do ponto 1.8.9.5 para mais orientações sobre a estabilidade das amostras durante o armazenamento).

▼M1

1.8.9.2. *Número de frascos e de amostras*

Preparar um número suficiente de frascos de ensaio para incluir:

— frascos de ensaio; frascos pelo menos em duplicado (e, de preferência, um mínimo de três) para cada concentração da substância em estudo ou diversos frascos por concentração, quando se recolherem frascos inteiros em cada momento de amostragem (representados pelo símbolo F_T),

— frascos de ensaio para o cálculo do balanço de massas; frascos pelo menos em duplicado para cada concentração em estudo (representados pelo símbolo F_M),

— controlos «brancos», sem adição da substância em estudo; pelo menos um frasco de ensaio «branco», contendo apenas água de ensaio (representado pelo símbolo F_B),

— controlo de referência; frascos em duplicado, com a substância de referência (p.ex.: anilina ou benzoato de sódio, a 10 μg/l) (representados pelo símbolo F_C). O objectivo do controlo de referência é confirmar a existência de uma actividade microbiana mínima. Quando for conveniente, poderá ser utilizada uma substância de referência marcada com um isótopo, mesmo nos casos em que a degradação da substância em estudo seja acompanhada por análise química,

— controlo estéril; um ou dois frascos com água de ensaio esterilizada, para analisar a possível degradação abiótica ou outro tipo de eliminação não-biológica da substância em estudo (representados pelo símbolo F_S); A actividade biológica pode ser interrompida por tratamento em autoclave (121° C; 20 min) da água de ensaio, pela adição de um produto tóxico (p.ex.: azoteto de sódio (NaN_3) a 10-20 g/l, cloreto de mercúrio ($HgCl_2$) a 100 mg/l ou formalina a 100 mg/l) ou por irradiação com raios gama. Se se utilizar $HgCl_2$, deve ser eliminado como resíduo tóxico. No caso de águas com grande quantidade de sedimento, nem sempre é fácil conseguir obter condições de esterilidade; nesses casos, recomenda-se a repetição do tratamento em autoclave (p.ex.: três vezes). Deve ter-se em atenção que as características de adsorção do sedimento poderão ser alteradas pelo tratamento em autoclave,

— controlos do solvente, contendo água de ensaio e água de ensaio com a substância de referência; frascos em duplicado, tratados com a mesma quantidade de solvente e sujeitos ao mesmo procedimento que os frascos a que foi adicionada a substância em estudo. O objectivo é verificar os eventuais efeitos adversos do solvente, através da determinação da degradação da substância de referência.

Para a definição do método de ensaio, o investigador deverá tomar em consideração a importância relativa do aumento do número de replicados contra o aumento do número de pontos de amostragem. O número exacto de frascos que serão necessários dependerá do método utilizado para a medição da degradação (ver o terceiro parágrafo do ponto 1.8.9.1, o ponto 1.8.9.4 e o apêndice 3).

▼M1

Em cada momento de amostragem, devem ser retiradas de cada frasco de ensaio duas subamostras (p.ex.: aliquotas de 5 ml). Se se utilizar um regime com amostragem de frascos inteiros em cada momento de amostragem, devem ser sacrificados dois frascos para cada amostra (ver o primeiro parágrafo do ponto 1.8.9.1).

1.8.9.3. *Preparação dos frascos para o ensaio com sedimento em suspensão (facultativo)*

Acrescentar os volumes necessários de água de ensaio e de sedimento, se for o caso, aos frascos de ensaio (ver o ponto 1.8.5). A preparação dos frascos para o ensaio com sedimento em suspensão é idêntica à dos frascos para o ensaio pelágico (ver os pontos 1.8.9.1 e 1.8.9.2). Utilizar, de preferência, frascos de soro ou de forma semelhante. Colocar os frascos num agitador, em posição horizontal. Como é óbvio, os frascos abertos, utilizados para as substâncias não voláteis e não marcadas com ^{14}C devem ser colocados em posição vertical; nesse caso, recomenda-se a utilização de agitação magnética, com barras de agitação revestidas a vidro. Se necessário, arejar os frascos para manter condições aeróbicas adequadas.

1.8.9.4. *Determinações radioquímicas*

O $^{14}CO_2$ resultante da degradação é medido de forma directa e indirecta (ver o apêndice 3). O $^{14}CO_2$ é determinado indirectamente pela diferença entre a actividade ^{14}C inicial na água ou suspensão de ensaio e a actividade total residual no momento da amostra, medida após acidificação da amostra a pH 2-3 e purga do CO_2. Dessa forma, o carbono inorgânico é removido, pelo que a actividade residual medida provém do material orgânico. A determinação indirecta do $^{14}CO_2$ não deve ser utilizada quando os principais metabolitos da degradação da substância de ensaio sejam voláteis (ver o apêndice 3). Se possível, a evolução do $^{14}CO_2$ deverá ser medida de forma directa (ver o apêndice 3), em cada momento de amostragem, em pelo menos um frasco de ensaio; esse procedimento permite, por um lado, obter os balanços mássicos e, por outro, verificar a evolução do processo de degradação, mas está limitado aos ensaios conduzidos com frascos fechados.

Se o $^{14}CO_2$ resultante da degradação for medido directamente durante o ensaio, devem ser previstos, no início do mesmo, um número suficiente de frascos para o efeito. A determinação directa do $^{14}CO_2$ é recomendada nos casos em que os principais metabolitos resultantes da transformação da substância em estudo sejam voláteis. Em cada ponto de medição, os frascos adicionais serão acidificados até pH de 2-3 e o $^{14}CO_2$ será recolhido num adsorvente interno ou externo (ver o apêndice 3).

A título facultativo, as concentrações da substância em estudo marcada com ^{14}C e dos principais metabolitos poderão ser determinadas por radiocromatografia (p.ex.: cromatografia em camada fina, RAD-TLC) ou por HPLC com detector de radionuclídeos.

Ainda a título facultativo, poderá determinar-se a distribuição da radioactividade remanescente pelas diferentes fases (ver o apêndice 1) e a concentração residual da substância em estudo e dos metabolitos.

▼M1

No final do ensaio, o balanço mássico deverá ser determinado através de medição directa do $^{14}CO_2$, utilizando frascos de ensaio diferentes, dos quais não tenham sido retiradas amostras durante o ensaio (ver o apêndice 3).

1.8.9.5. *Análise química específica*

Se existir um método analítico específico com uma sensibilidade suficiente, a biodegradação primária poderá ser avaliada medindo a concentração residual total da substância de ensaio, em vez de utilizar técnicas de radiomarcação. Se for utilizada uma substância marcada com um radioisótopo (para medição da mineralização total), poderão ser efectuadas em paralelo análises químicas específicas, a fim de obter informação adicional que possa ser útil e de verificar o procedimento utilizado. As análises químicas específicas poderão igualmente ser utilizadas para a medição dos metabolitos formados durante a degradação da substância em estudo, sendo recomendadas para as substâncias que mineralizam com uma meia-vida superior a 60 dias. A concentração da substância em estudo e dos respectivos metabolitos deve ser determinada e comunicada para cada momento de amostragem (sob a forma de uma concentração e, quando aplicável, de uma percentagem). Em geral, os metabolitos detectados com uma concentração ≥ 10 % da concentração aplicada em qualquer momento do ensaio devem ser identificados, a não ser que a sua presença possa ser razoavelmente justificada por qualquer outro mecanismo que não a degradação da substância em estudo. Deverá considerar-se a hipótese de identificação de todos os metabolitos cuja concentração aumente continuamente ao longo do ensaio, mesmo que a sua concentração nunca ultrapasse o limite acima indicado, já que essa característica poderá indicar que se trata de produtos persistentes. A análise dos metabolitos nos controlos estéreis deve ser ponderada nos casos em que se considera possível a ocorrência de transformação biótica rápida (hidrólise) da substância em estudo. A necessidade de quantificação e de identificação dos metabolitos deve ser ponderada numa base casuística, devendo, quando for realizada, ser justificada no relatório de ensaio. As técnicas de extracção com solventes orgânicos devem ser aplicadas de acordo com as instruções apresentadas nos respectivos procedimentos analíticos.

As amostras devem ser conservadas hermeticamente fechadas entre 2 e 4 °C, se a análise for realizada num prazo de 24 horas (preferível). Para um armazenamento mais prolongado, as amostras devem ser congeladas abaixo dos – 18 °C ou conservadas com adição de químicos. A acidificação não é um método recomendado para a conservação das amostras, na medida em que as amostras acidificadas poderão ser instáveis. Se as amostras não forem analisadas num prazo de 24 horas e forem armazenadas por um período prolongado, deverá proceder-se a um estudo de estabilidade durante o armazenamento, a fim de demonstrar a estabilidade das substâncias de interesse em condições de armazenamento a – 18 °C ou com conservantes químicos. Se o método analítico implicar a extracção com solventes ou em fase sólida (SPE), essa extracção deverá ser efectuada imediatamente após a amostragem ou depois de conservar a amostra refrigerada por um prazo máximo de 24 horas.

Dependendo da sensibilidade do método analítico, poderá ser necessário recolher volumes superiores aos que são indicados no ponto 1.8.1. O ensaio pode ser realizado de forma simples com volumes de ensaio de 1 l, em frascos com uma capacidade de 2-3 l, o que torna possível a recolha de amostras de aproximadamente 100 ml.

▼M1

2. **RESULTADOS E APRESENTAÇÃO DE RELATÓRIOS**

2.1. TRATAMENTO DOS RESULTADOS

2.1.1. **Apresentação dos resultados**

Arredondar os momentos de amostragem às horas (a não ser nos casos em que a substância em estudo se degrade substancialmente numa questão de minutos ou de horas), mas não aos dias. Marcar num gráfico as estimativas da actividade residual da substância em estudo (para as substâncias marcadas com ^{14}C) ou da concentração residual (para as substâncias não marcadas) em função do tempo, tanto em papel milimétrico como em papel semilogarítmico (ver as figuras 1a, 1b). Se tiver ocorrido degradação, comparar os resultados dos frascos F_T com os dos frascos F_S. Se as médias dos resultados dos frascos com a substância de ensaio (F_T) e dos frascos estéreis (F_S) apresentarem um desvio inferior a 10 %, pode assumir-se que a degradação observada se deve principalmente a factores abióticos. Se a degradação for menor nos frascos F_S, os respectivos valores poderão ser utilizados para corrigir (por subtracção) os valores relativos aos frascos F_T, de modo a poder estimar a dimensão da biodegradação. Quando se efectuarem análises facultativas dos principais metabolitos, os gráficos da sua formação e destruição devem ser apresentados, juntamente com um gráfico da evolução da concentração da substância em estudo.

Estimar a duração da fase de latência, t_L, a partir da curva de degradação (gráfico semilogarítmico), extrapolando a sua parte linear até ao ponto de degradação zero ou, em alternativa, determinando o tempo necessário para que ocorra uma degradação de cerca de 10 % (ver as figuras 1a e 1b). A partir do gráfico semilogarítmico, estimar a constante de primeira ordem k e o respectivo erro-padrão, por regressão do ln (valor residual da actividade ^{14}C ou da concentração da substância) em função do tempo. Em relação às medições do ^{14}C, em particular, utilizar apenas os dados da parte inicial linear da curva, após o final da fase de latência, sendo preferível que se seleccionem poucos pontos que sejam significativos do que um número maior de pontos afectados de maior incerteza. Os factores de incerteza incluem, nesse caso, os erros inerentes à medição directa da actividade residual do ^{14}C, que é recomendada (ver abaixo). Por vezes, poderá ser relevante calcular duas constantes diferentes, quando a degradação apresentar duas fases bem distintas. Para tal, devem ser definidas as duas fases da curva de degradação. Os cálculos da taxa constante k e da meia-vida $t_{½} = \ln 2/k$ devem ser efectuados para cada um dos frascos replicados, quando forem retiradas subamostras de um mesmo frasco, ou utilizando valores médios, quando se recolherem frascos inteiros em cada momento de amostragem (ver o último parágrafo do ponto 1.8.9.2). Quando for utilizado o primeiro desses procedimentos, deverão apresentar-se a taxa constante e a meia-vida para cada um dos frascos replicados e ainda o seu valor médio, com o respectivo desvio padrão. Se se tiverem usado concentrações elevadas da substância em estudo, a curva de degradação poderá desviar-se consideravelmente de uma linha recta (gráfico semilogarítmico), caso em que não será válida uma cinética de primeira ordem. Logo, a definição a meia-vida deixará de fazer sentido. É possível, no entanto, que se possa aplicar uma cinética de pseudo primeira ordem numa gama limitada de concentrações, o que poderá permitir a definição do meio-tempo de degradação DT_{50} (tempo necessário para uma degradação de 50 %). Contudo, deve tomar-se em consideração que o decurso da degradação para lá da gama de concentrações seleccionada não pode ser previsto utilizando esse DT_{50}, que apenas descreve um conjunto específico de resultados. Existem diversos instrumentos analíticos que podem facilitar os cálculos estatísticos e o ajustamento das curvas, sendo recomendada a utilização de programas informáticos desse tipo.

▼M1

Se forem realizadas análises químicas específicas, calcular as taxas constantes e as meia-vida da degradação primária, como se descreve acima, para o caso da mineralização total. Se a degradação primária constituir o processo limitante, poderá ser possível, em certos casos, utilizar pontos de toda a curva de degradação. Isto acontece porque a medição, ao contrário do que acontece com as medições da actividade do ^{14}C, é directa.

Se forem utilizadas substâncias marcadas com ^{14}C, deve ser apresentado, pelo menos em relação ao momento final do ensaio, um balanço de massas expresso em percentagem da concentração inicial aplicada.

2.1.2. **Actividade residual**

Quando a parte de uma substância orgânica que está marcada com ^{14}C é biodegradada, a maior parte do ^{14}C é convertido em $^{14}CO_2$, enquanto que outra parte é utilizada para a produção de biomassa e/ou para a síntese de metabolitos extracelulares. Logo, a degradação completa «final» de uma substância não resulta numa conversão de 100 % do respectivo carbono em $^{14}CO_2$. O ^{14}C integrado em metabolitos da biosíntese é posteriormente libertado, de forma lenta, como $^{14}CO_2$, num processo de «mineralização secundária». Por esse motivo, a actividade residual do ^{14}C orgânico (medida após purga do CO_2) ou do $^{14}CO_2$ produzido em função do tempo apresenta uma parte final com um declive muito baixo, após a conclusão da degradação. Esse factor vem complicar a interpretação cinética dos dados e, portanto, só a parte inicial da curva (a partir do final da fase de latência e até à degradação de aproximadamente 50 % da substância presente) deverá normalmente ser utilizada para a estimação de uma taxa constante de degradação. Se a substância em estudo for degradada, a actividade total do ^{14}C orgânico residual será sempre superior à actividade do ^{14}C associada à substância em estudo que permanece intacta. Se a substância em estudo for degradada segundo uma cinética de primeira ordem e se uma fracção constante, α, for mineralizada em CO_2, o declive inicial da curva de desaparecimento do ^{14}C (^{14}C orgânico total em função do tempo) será α vezes superior ao declive da correspondente curva de concentração da substância em estudo (ou, em termos mais precisos, da parte da substância em estudo marcada com ^{14}C). Se se utilizarem as medições não corrigidas da actividade total de ^{14}C orgânico, a taxa constante de degradação calculada será, portanto, subavaliada. A literatura especializada descreve alguns procedimentos para a estimação das concentrações da substância em estudo a partir da actividade radioquímica medida, com base em diversos pressupostos de simplificação (2)(9)(10)(11). Esses procedimentos serão mais facilmente aplicáveis às substâncias de degradação rápida.

2.2. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Se se constatar que k é independente da concentração adicionada (ou seja, se o k calculado for aproximadamente o mesmo para todas as concentrações da substância em estudo), poderá assumir-se que a taxa constante de primeira ordem é representativa das condições de ensaio utilizadas, ou seja, da substância em estudo, da amostra de água e da temperatura de ensaio. Só a experiência permitirá decidir até que ponto os resultados podem ser generalizados ou extrapolados para outros sistemas. Se se utilizar uma concentração elevada da substância em estudo e se a degradação não ocorrer, portanto, segundo uma cinética de primeira ordem, os dados não poderão ser utilizados para a estimação directa de uma taxa constante de primeira ordem ou da correspondente meia-vida. No entanto, os dados recolhidos a partir de um ensaio com elevada concentração da substância em estudo poderão ainda ser utilizáveis para a estimação do grau de mineralização total e/ou dos limites de detecção e de quantificação dos metabolitos.

▼M1

Se as taxas de outros processos, diferentes da biodegradação, que causam a perda da substância (p.ex.: hidrólise ou volatilização) forem conhecidas, poderão ser subtraídas da taxa líquida de desaparecimento da substância observada ao longo do ensaio, de modo a obter uma estimativa aproximada da taxa de biodegradação. Os dados relativos à hidrólise podem se obtidos, por exemplo, a partir dos frascos de controlo estéreis ou de ensaios paralelos com uma concentração mais elevada da substância em estudo.

A determinação, directa e indirecta, do $^{14}CO_2$ (ponto 1.8.9.4 e anexo 3) só pode ser utilizada para medir o grau de mineralização da substância em estudo em CO_2. A radiocromatografia (RAD-TLC) ou o HPLC podem ser utilizados para analisar as concentrações da substância de ensaio marcada com ^{14}C e a formação dos principais metabolitos (ver o terceiro parágrafo do ponto 1.8.9.4). A fim de permitir a estimação directa da meia-vida, é necessário que não esteja presente nenhum dos principais metabolitos (definidos como os metabolitos cuja concentração é $\geq$ 10 % da quantidade da substância em estudo utilizada. Se estiverem presentes metabolitos principais, de acordo com essa definição, será necessário proceder a uma análise pormenorizada dos dados. Essa análise poderá incluir a repetição de ensaios e/ou a identificação dos metabolitos (ver o primeiro parágrafo do ponto 1.8.9.5), a não ser quando o destino dos produtos de transformação possa ser razoavelmente avaliado com base na experiência adquirida (p.ex.: informação sobre a sequência de reacções da degradação). Na medida em que a proporção do carbono da substância em estudo que é transformada em CO_2 varia (dependendo, em grande medida, da concentração da substância e de outros substratos disponíveis, das condições de ensaio e da população microbiana), este ensaio não permite uma estimação simples da biodegradação final, como acontece com o ensaio de redução gradual do COD, mas o seu resultado é semelhante ao obtido no caso dos ensaios respirométricos. O grau de mineralização será, portanto, menor ou igual do que o nível mínimo da degradação final. Para conseguir obter uma imagem mais completa da biodegradação final (mineralização e incorporação sob a forma de biomassa), deverá ser efectuada, no final do ensaio, uma análise da distribuição do ^{14}C pelas diferentes fases (ver o apêndice 1). O ^{14}C presente na fase particulada será composto pelo ^{14}C incorporado na biomassa bacteriana e pelo ^{14}C adsorvido sobre outras partículas orgânicas.

2.3. VALIDADE DO ENSAIO

Se a substância de referência não for degradada durante o período em que isso seria de esperar (no caso da anilina e do benzoato de sódio, normalmente menos de duas semanas), a validade do ensaio será duvidosa e deverá ser verificada de forma mais aprofundada; em alternativa, o ensaio deverá ser repetido com uma nova amostra de água. Durante um ensaio de anel ISO do presente método, com a participação de sete laboratórios de toda a Europa, as constantes da taxa de degradação para a anilina variaram entre 0,3 e 1,7 dia^{-1}, com uma média de 0,8 d^{-1} a 20 ºC e um desvio-padrão de ± 0,4 d^{-1} ($t_{½}$ = 0,9 dias). A fase de latência tipicamente observada é de 1 a 7 dias. As águas analisadas tinham, de acordo com os relatórios apresentados, uma biomassa bacteriana correspondente a 10^3 -10^4 unidades formadoras de colónias (CFU) por ml. As taxas de degradação medidas nas águas ricas em nutrientes da Europa Central foram superiores às das águas nórdicas, oligotróficas, o que poderá dever-se a uma situação trófica diferente ou a uma exposição anterior a substâncias químicas.

A recuperação total (balanço de massas) no final da experiência deverá situar-se entre os 90-110 % para as substâncias marcadas com um radioisótopo, enquanto que a recuperação inicial no início da experiência se deverá situar entre os 70-110 % para as substâncias não marcadas. No entanto, estes intervalos devem ser interpretados como um objectivo, não devendo ser utilizados como critério de aceitação do ensaio.

▼M1

3. **RELATÓRIO DE ENSAIO**

O relatório deve indicar claramente o tipo de ensaio, ou seja, se se trata de um ensaio pelágico ou com sedimento em suspensão, para além da seguinte informação:

Substância em estudo e substância(s) de referência:

— nomes comuns, nomes químicos (nomes IUPAC e/ou CAS recomendados), números CAS, fórmulas estruturais (indicando a posição do ^{14}C, quando se utilizarem substâncias marcadas) e propriedades físico-químicas relevantes da substância em estudo e da substância de referência (ver os pontos 1.5 e 1.6),

— nomes químicos, números CAS, fórmulas estruturais (indicando a posição do ^{14}C, quando se utilizarem substâncias marcadas) e propriedades físico-químicas relevantes das substâncias utilizadas como padrão para a identificação e quantificação dos metabolitos,

— pureza (impurezas) da substância em estudo e das substâncias de referência,

— pureza radioquímica da substância marcada e respectiva actividade específica (se aplicável).

Águas de superfície:

Deve ser fornecida, no mínimo, a seguinte informação em relação à amostra de água:

— localização e descrição do local de amostragem, incluindo, se possível, os antecedentes conhecidos em termos de poluição,

— data e hora da recolha da amostra,

— nutrientes (N total, amónio, nitritos, nitratos, P total, ortofosfatos dissolvidos),

— profundidade da colheita,

— aspecto da amostra (p.ex.: cor e turbidez),

— COD e COT,

— CBO,

— temperatura e pH no local e momento da amostragem,

— oxigénio ou potencial redox (obrigatório apenas quando as condições aeróbicas não sejam óbvias),

— salinidade e condutividade (no caso da água do mar e da água salobra),

— sólidos em suspensão (caso a amostra se apresente turva),

— eventualmente, outra informação relevante acerca do local de amostragem no momento da mesma (p.ex.: dados actuais ou passados sobre o caudal dos rios ou correntes marinhas, descargas importantes que se encontram próximas e o respectivo tipo, condições meteorológicas que precederam a recolha da amostra),

e, facultativamente:

— biomassa microbiana (p.ex.: contagem directa com laranja de acridina ou número de unidades formadoras de colónias),

▼M1

— carbono inorgânico,

— concentração de clorofila-a, como estimativa específica da biomassa de algas.

Quando se proceder a um ensaio com sedimentos em suspensão, deverá também ser fornecida a seguinte informação sobre os sedimentos:

— profundidade da colheita de sedimento,

— aparência do sedimento (p.ex.: colorido, lamacento, lodoso ou arenoso),

— textura (p.ex.: % de areão, de areia fina, de lodo e de argilas),

— peso seco dos sólidos em suspensão, em g/l, concentração do COT ou perda de peso após combustão, como medição do conteúdo em matéria orgânica,

— pH,

— oxigénio ou potencial redox (obrigatório apenas quando as condições aeróbicas não sejam óbvias).

Condições de ensaio:

— período decorrido entre a recolha das amostras e a respectiva utilização no ensaio, condições de armazenamento e de pré-tratamento das amostras, data de realização dos estudos,

— quantidade da substância em estudo aplicada, concentrações de ensaio e substância de referência,

— método de aplicação da substância em estudo, incluindo a eventual utilização de solventes,

— volume de água de superfície e de sedimentos (se aplicável) utilizados, e volume recolhido em cada amostra para fins de análise,

— descrição do sistema de ensaio utilizado.

Se as culturas não forem mantidas em ambiente escuro, informação sobre as condições de «luz difusa»:

— informação sobre o(s) método(s) utilizado(s) para a preparação dos controlos estéreis (p.ex.: temperatura, duração e número de tratamentos em autoclave),

— temperatura de incubação,

— informação sobre as técnicas analíticas e sobre o(s) método(s) utilizado(s) para as medições da actividade radioquímica, para a verificação dos balanços de massa e para a medição da distribuição pelas fases (se for efectuada),

— número de replicados.

Resultados:

— percentagens de recuperação (ver o ponto 1.7.1),

— reproductividade e sensibilidade dos métodos analíticos utilizados, incluindo os respectivos limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) (ver o ponto 1.7.2),

▼M1

— todos os dados medidos (incluindo o momento das amostragens), tabela com os valores calculados e curvas de degradação; para cada concentração estudada e para cada frasco replicado, apresentar o coeficiente de correlação linear correspondente ao declive do gráfico logarítmico, a duração estimada da fase de latência e (se possível) uma taxa constante de primeira ordem ou de pseudo primeira ordem, bem como a correspondente meia-vida (ou período de meia-vida, t_{50}),

— comunicar os valores relevantes, p.ex.: duração da fase de latência, taxa constante e meia-vida de degradação (ou t_{50}), sob a forma de uma média dos resultados observados nos diferentes replicados,

— classificar o sistema como adaptado ou não-adaptado, a julgar pelo aspecto da curva de degradação e pela possível influência da concentração de ensaio,

— resultados da verificação final dos balanços de massa e das medições da distribuição pelas diferentes fases (se efectuadas),

— fracção do ^{14}C mineralizada e, caso sejam utilizadas análises específicas, nível final da degradação primária,

— identificação, concentração molar e percentagem da substância aplicada e dos principais metabolitos (ver o primeiro parágrafo do ponto 1.8.9.5), quando aplicável,

— proposta de esquema da sequência de reacções, quando aplicável,

— discussão dos resultados.

4. **BIBLIOGRAFIA**

1. OECD TG 309 (2004) Aerobic Mineralisation in surface water — Simulation Biodegradation Test.

2. ISO/DIS 14592-1 (1999) Water quality — Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations — Part 1: Shake flask batch test with surface water or surface water/sediment suspensions.

3. Testing Method C.23. Aerobic and anaerobic transformation in soil.

4. Testing Method C.24. Aerobic and anaerobic transformation in aquatic sediments.

5. OECD (1993). Guidelines for the Testing of Chemicals. OECD, Paris.

6. ISO 8245 (1999). Water quality — Guidelines on the determination of total organic carbon (TOC) and dissolved organic carbon (DOC).

7. ISO 10634 (1995). Water quality — Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

8. OECD draft (2000). Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, N.º 22.

▼**M1**

9. Simkins, S. and Alexander, M. (1984). Models for mineralization kinetics with the variables of substrate concentration and population density. Appl. Environ. Microbiol.47, 394-401.

10. Ingerslev, F. and N. Nyholm. (2000). Shake-flask test for determination of biodegradation rates of ^{14}C-labeled chemicals at low concentrations in surface water systems. Ecotoxicol. Environ. Saf. 45, 274-283.

11. ISO/CD 14592-1 (1999). Ring test report: Water Quality — Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations part 1 — report of 1998/1999 ring-test. Shake flask batch test with surface water or surface water/sediment suspensions.

▼M1

Apêndice 1

Distribuição do ^{14}C pelas diferentes fases

Para efeitos da verificação do procedimento, as medições rotineiras da actividade residual do ^{14}C orgânico total (TOA) devem ser complementadas por medições dos balanços de massa, que indicam a determinação directa do $^{14}CO_2$ produzido após captura num adsorvente (ver o anexo 3). A formação de $^{14}CO_2$ representa, por si só, uma prova directa de biodegradação, por oposição à degradação abiótica ou a outros mecanismos de redução da concentração da substância, como a volatilização ou a adsorção. Alguma informação útil para a caracterização do comportamento em termos de biodegradabilidade pode ser obtida medindo a distribuição do TOA entre a fase de solução (actividade do ^{14}C orgânico dissolvido, DOA) e a fase particulada (actividade do ^{14}C orgânico particulado, POA), após separação das partículas por filtração através de membrana ou por centrifugação. A POA consiste na substância adsorvida sobre a biomassa microbiana e sobre outras partículas, para além do carbono marcado proveniente da substância em estudo e que tenha sido utilizado para a síntese de novo material celular, sendo assim incorporado na fracção da biomassa particulada. A formação de material orgânico dissolvido com ^{14}C pode ser estimada pela DOA no final da biodegradação (parte em que a curva da degradação em função do tempo passa a ser paralela ao eixo dos ×).

Estimar a distribuição do ^{14}C pelas fases em amostras seleccionadas, por filtração das amostras através de um filtro de membrana com diâmetro de poro de 0,22 μm ou de 0,45 μm, num material que não seja significativamente adsorvente em relação à substância em estudo (os filtros de policarbonato poderão servir). Caso a adsorção da substância em estudo no filtro seja demasiado importante para que possa ser ignorada (a verificar antes de iniciar a experiência) poderá utilizar-se, em vez da filtração, um procedimento de centrifugação a alta velocidade (2 000 g, 10 min).

Proceder à filtração ou à centrifugação de amostras não filtradas, como se descreve no anexo 3. Dissolver os filtros de membrana num fluído de cintilação adequado e proceder à contagem do modo habitual, utilizando apenas o método do rácio externo padrão para corrigir a atenuação, ou utilizar um oxidante das amostras. Se se tiver procedido a centrifugação, ressuspender o *pellet* formado pela fracção particulada em 1-2 ml de água destilada e transferir para uma célula de cintilómetro. Lavar duas vezes com 1 ml de água destilada e transferir a água da lavagem para a célula. Se necessário, a suspensão poderá ser colocada num gel para a contagem por cintilação em meio líquido.

▼M1

Apêndice 2

Procedimento semicontínuo

Para conseguir chegar a uma degradação suficiente das substâncias mais recalcitrantes, poderá ser necessário incubar as culturas durante períodos que poderão chegar a vários meses. A duração do ensaio não deverá normalmente ultrapassar 60 dias, a não ser quando as características da amostra original da água possam ser mantidas através da renovação da suspensão de ensaio. O período de ensaio poderá, no entanto, ser alargado até um máximo de 90 dias, sem renovação da suspensão de ensaio, se a degradação da substância em estudo se tiver iniciado durante os primeiros 60 dias.

Durante a incubação por longos períodos, a diversidade da comunidade microbiana poderá reduzir-se devido a diferentes mecanismos de perda e também ao esgotamento de nutrientes essenciais e substratos primários de carbono na água de ensaio. Assim, recomenda-se a utilização de um ensaio em semicontínuo, a fim de determinar de forma apropriada a taxa de degradação das substâncias em que esse processo é mais lento. O ensaio deve ser iniciado utilizando um procedimento semicontínuo quando a experiência anterior mostrar que será necessário um período de incubação de três meses para conseguir a degradação de 20 % da substância presente. Se não for esse o caso, o ensaio normal, em modo descontínuo, poderá ser transformado num ensaio semicontínuo se não se observar nenhuma degradação da substância em estudo durante aproximadamente 60 dias de ensaio em descontínuo. Pode interromper-se o procedimento semicontínuo e continuar o ensaio em descontínuo a partir do momento em que se tenha registado uma degradação substancial (p.ex.: > 20 %).

No ensaio semicontínuo, cerca de um terço do volume da suspensão de ensaio será substituída, a cada quinze dias, por água acabada de recolher à qual foi adicionada a substância em estudo à concentração inicial pretendida. Se o ensaio for realizado com sedimento em suspensão, o sedimento será igualmente adicionado à água de substituição, com a mesma concentração inicial do ensaio (entre 0,01 e 1 g/l). Para efeitos da realização de um ensaio com sólidos sedimentares em suspensão, é importante manter o sistema em suspensão permanente, mesmo durante a mudança de água, e um tempo de residência seja idêntico para os sólidos e para a água, já que de outra forma a pretendida similaridade com um sistema aquoso homogéneo sem fases definidas não estará garantida. Por essas razões, quando se utilizar o regime semicontínuo será preferível utilizar uma concentração inicial de sólidos em suspensão na parte inferior do intervalo de concentrações sugerido.

A substância em estudo deve ser adicionada com uma concentração que faça com que a concentração inicial não seja ultrapassada aquando da renovação parcial da suspensão de ensaio, o que permitirá evitar os fenómenos de adaptação que ocorrem frequentemente a altas concentrações da substância em estudo. Na medida em que o procedimento implica tanto uma reinoculação como a compensação dos nutrientes e substratos primários entretanto esgotados, a diversidade microbiana original é reposta, pelo que o ensaio poderá, teoricamente, prolongar-se até ao infinito. Quando se utiliza o procedimento semicontínuo, é importante notar que a concentração residual da substância em estudo deve ser corrigida em função das quantidades removidas e adicionadas em cada renovação. A concentração total e a concentração em solução da substância de ensaio podem ser tratadas como equivalentes no caso dos compostos com baixa adsorção. A adsorção é insignificante (< 5 %), nas condições de ensaio (0,1-1 g sólidos/l) para as substâncias em que log Kow < 3 (válido para compostos lipofílicos neutros). Essa característica é ilustrada pelo seguinte exemplo: 0,1 g/l de sólidos correspondem, mais ou menos, a 10 mg de carbono por litro (fracção carbono, $f_C = 0{,}01$). Assumindo que:

Log K_{ow} (da substância de ensaio) = 3

$K_{oc} = 0{,}42 \times K_{ow}$

Coeficiente de partição, $K_d = f_C \times K_{oc}$

logo, a fracção dissolvida da concentração total (C-água (C_w)/C-total (C_t) será:

$C_w/C_t = 1/(1 + K_d \times SS) = 1(1 + K_{oc} \times f_C \times SS) = 1/(1 + 0{,}42 \times 10^3 \times 0{,}01 \times 0{,}1 \times 10^{-3}) = 0{,}999$

▼M1

Apêndice 3

Determinação do $^{14}CO_2$

Determinação indirecta do $^{14}CO_2$

Para as medições de rotina, o método indirecto é geralmente o mais rápido e preciso, quando a substância de ensaio e os respectivos metabolitos não forem voláteis. Transferir simplesmente amostras não filtradas, por exemplo com um volume de 5 ml, para células de cintiloscópio. A actividade das amostras deverá localizar-se inicialmente entre os 5 000 dpm-10 000 dpm (80-170 Bq), sendo a actividade mínima inicial, normalmente, da ordem dos 1 000 dpm. O CO_2 deve ser purgado após acidificação das amostras a pH 2-3 com uma ou duas gotas de HCl ou H_3PO_4 concentrado. A purga do CO_2 pode ser feita por borbulhamento com ar durante cerca de ½-1 hora. Em alternativa, agitar vigorosamente as células (p.ex.: em agitador orbital) durante 1-2 horas ou, com agitação menos vigorosa, de um dia para o outro. A eficiência da purga de CO_2 deve ser verificada (prolongando o período de arejamento ou de agitação). Adicionar depois um líquido de cintilação adequado para a contagem de amostras aquosas, homogeneizar a amostra num agitador orbital e determinar a radioactividade por contagem de cintilação do líquido, subtraindo a actividade de base encontrada nos brancos utilizados no ensaio (F_B). A não ser nos casos em que a água de ensaio seja muito corada ou contenha uma elevada concentração de partículas, as amostras devem normalmente apresentar uma atenuação uniforme, pelo que será suficiente proceder a correcções da atenuação utilizando um padrão externo. Se a água de ensaio se apresentar muito corada, poderá ser necessário proceder a uma correcção adicional da atenuação utilizando um padrão interno. Se a concentração de partículas for elevada poderá ser difícil obter uma solução ou gel homogéneo, ou poderão ocorrer variações de atenuação demasiado grandes de amostra para amostra. Nesse caso, poderá ser utilizado o método de contagem descrito abaixo para as lamas. Se o ensaio for realizado com sedimento em suspensão, a medição do $^{14}CO_2$ poderá ser efectuada indirectamente retirando uma amostra homogénea de 10 ml da água/suspensão de ensaio e separando as respectivas fases por centrifugação a uma velocidade apropriada (p.ex.: 40 000 m/s^2 durante 15 min). A fase aquosa deverá então ser tratada como se descreve acima. Para a determinação da actividade de ^{14}C da fase particulada (POA), ressuspender o sedimento num pequeno volume de água destilada, transferir para as células de cintiloscópio e adicionar líquido de cintilação de modo a formar um gel (existem líquidos de cintilação especiais para esse efeito). Dependendo da natureza das partículas (nomeadamente do respectivo teor de matéria orgânica), poderá ser viável proceder à digestão da amostra, de um dia para o outro, numa solução que dissolva os tecidos e depois à respectiva homogeneização em agitador orbital, antes de adicionar o líquido de cintilação. Em alternativa, a POA pode ser determinada por combustão em presença de oxigénio excedentário, utilizando um oxidador de amostras. Para a contagem, devem ser sempre incluídos padrões internos, podendo ser necessário proceder a correcções da atenuação por adição de um padrão interno a cada uma das amostras.

Determinação directa do $^{14}CO_2$

Se o $^{14}CO_2$ produzido for medido directamente, será necessário prever, no início do ensaio, um número suficiente de frascos, que serão recolhidos em cada momento de amostragem e acidificados a pH 2-3, sendo o $^{14}CO_2$ recolhido num adsorvente interno (colocado em cada frasco de ensaio no início do mesmo) ou externo. Como agente adsorvente, podem utilizar-se produtos alcalinos (p.ex.: solução 1 N ou *pellets* de NaOH), etanolamina ou um adsorvente baseado na etanolamina que se encontre disponível no mercado. Quando as medições do $^{14}CO_2$ sejam feitas de forma directa, os frascos de ensaio devem ser hermeticamente fechados, por exemplo com rolhas de borracha butírica.

▼**M1**

Figura 1a

Exemplo de um gráfico aritmético dos dados (actividade residual em função do tempo)

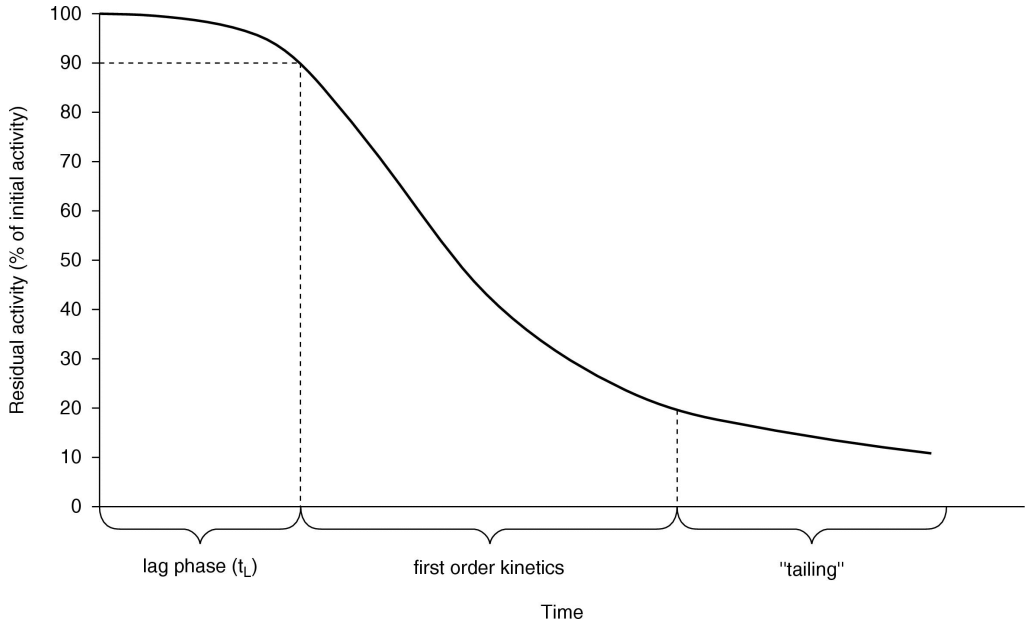
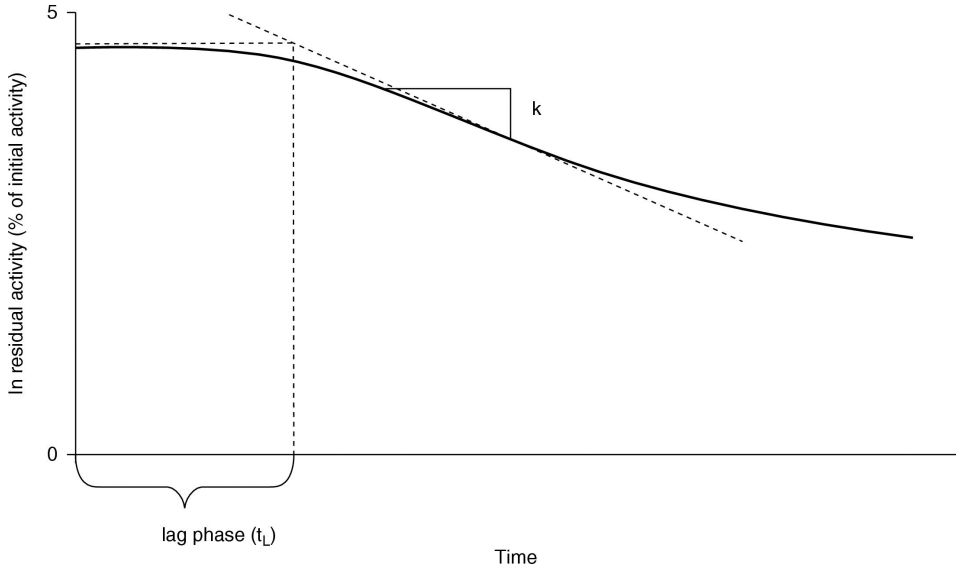


Figura 1b

Exemplo de um gráfico semilogarítmico dos dados (ln da actividade residual em função do tempo)



▼M6

C.26. ESPÉCIES DO GÉNERO *LEMNA* — ENSAIO DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO

INTRODUÇÃO

1. Este método é equivalente ao *Test Guideline* TG 221 (2006) da OCDE. Foi concebido para avaliar a toxicidade de determinados produtos químicos para as plantas aquáticas do género *Lemna* (lentilha-d'água). Baseia-se nos métodos existentes (1) (2) (3) (4) (5) (6), mas inclui modificações destes de forma a ter em conta a investigação mais recente e as consultas realizadas sobre uma série de questões. O método foi validado por um estudo interlaboratorial comparativo (7).

2. O presente método de ensaio descreve ensaios de toxicidade com as espécies *Lemna gibba* e *Lemna minor*, que foram extensamente estudadas e são objeto das normas acima referidas. A taxonomia das *Lemna* spp. é complexa, devido à existência de diversos fenótipos. Embora a resposta das *Lemna* aos agentes tóxicos possa ser afetada pela variabilidade genética, a informação atual sobre essa fonte de variabilidade não permite recomendar um clone específico para a utilização no presente método de ensaio. Cabe aqui notar que, embora o ensaio não seja realizado com culturas puras, são tomadas medidas, em diversas fases, para reduzir ao mínimo a contaminação por outros organismos.

3. São descritos os pormenores do ensaio com renovação (semiestático e em contínuo) e sem renovação (estático) da solução de ensaio. Consoante os objetivos do ensaio e as exigências regulamentares, recomenda-se ponderar a possibilidade de aplicação dos métodos semiestático e em contínuo: por exemplo, para os produtos químicos que desaparecem rapidamente da solução por efeito de volatilização, fotodegradação, precipitação ou biodegradação. Para mais orientações, consultar a referência bibliográfica (8).

4. Os conceitos utilizados são definidos no apêndice 1.

PRINCÍPIO DO ENSAIO

5. Fazem-se culturas de plantas do género *Lemna* em crescimento exponencial, com diferentes concentrações do produto químico em estudo, durante sete dias. O objetivo do ensaio consiste em quantificar os efeitos do produto químico em estudo sobre o crescimento vegetativo durante aquele período, com base na avaliação de determinadas variáveis de medição. O número de frondes é a variável de medição primária. É também medida, pelo menos, uma outra variável de medição (área total, peso seco ou peso fresco das frondes), já que certos produtos químicos podem afetar outras variáveis de medição de forma muito mais marcada do que o número de frondes. Para quantificar os efeitos relacionados com o produto químico em estudo, compara-se o crescimento nas soluções de ensaio com o dos controlos e determina-se a concentração que causa uma inibição de x % no crescimento (por exemplo, 50 %), expressa como EC_x (nesse caso, EC_{50}).

6. O ponto final do ensaio é a inibição do crescimento, expressa como o aumento logarítmico da variável de medição (taxa média de crescimento específico) durante o período de exposição. A partir das taxas médias de crescimento específico registadas numa série de soluções de ensaio, a concentração que causa uma inibição de x % na taxa de crescimento (por exemplo, 50 %) é determinada e expressa como E_rC_x (nesse caso, E_rC_{50}).

7. Uma outra variável de resposta utilizada no presente método de ensaio é o rendimento, que pode ser necessário para cumprir determinadas exigências regulamentares específicas de alguns países. Define-se como a diferença entre a biomassa no final e a biomassa no início do período de exposição. A partir dos rendimentos registados numa série de soluções de ensaio, a concentração que causa uma inibição de x % no rendimento (por exemplo, 50 %) é determinada e expressa como E_yC_x (nesse caso, E_yC_{50}).

▼M6

8. Por outro lado, podem ser determinadas estatisticamente a menor concentração com efeito observável (LOEC) e a concentração sem efeitos observáveis (NOEC).

INFORMAÇÕES SOBRE O PRODUTO QUÍMICO EM ESTUDO

9. Deve utilizar-se um método analítico com sensibilidade adequada para a quantificação do produto químico no meio de ensaio.

10. As informações sobre o produto químico em estudo que poderão ser úteis para estabelecer as condições do ensaio são, entre outras, as seguintes: fórmula estrutural, pureza, hidrossolubilidade, estabilidade à luz e em água, pK_a, K_{ow}, pressão de vapor e biodegradabilidade. A hidrossolubilidade e a pressão de vapor podem ser utilizadas para calcular a constante da Lei de Henry, que permitirá verificar a probabilidade de perdas significativas do produto químico em estudo durante o período de ensaio. Desta forma, poderá avaliar-se

11. Quando o controlo do pH do meio de ensaio é particularmente importante (por exemplo, no caso de ensaios com metais ou produtos químicos hidroliticamente instáveis), recomenda-se a adição de um tampão ao meio de cultura (ver ponto 21). Para mais orientações sobre o ensaio de produtos químicos cujas propriedades físico-químicas dificultam o ensaio, consultar a referência bibliográfica (8).

VALIDADE DO ENSAIO

12. Para que o ensaio seja válido, o tempo de duplicação do número de frondes no controlo deve ser inferior a 2,5 dias (60 horas), o que corresponde aproximadamente a uma multiplicação por 7 ao cabo de sete dias e a uma taxa média de crescimento específico de 0,275 d^{-1}. Utilizando os meios e as condições de ensaio descritas no presente método, este critério pode ser cumprido por meio de um regime de ensaio estático (5). Parte-se igualmente do princípio de que o critério poderá ser cumprido no caso de ensaios semiestáticos ou contínuos. O cálculo do tempo de duplicação figura no ponto 49.

PRODUTO QUÍMICO DE REFERÊNCIA

13. Para verificação do procedimento de ensaio, podem ser ensaiados um ou mais produtos químicos de referência, como o 3,5-diclorofenol, que se utiliza na prova internacional do anel (7). É aconselhável submeter ao ensaio um produto químico de referência pelo menos duas vezes por ano ou, se os ensaios forem realizados com menor frequência, em paralelo com a determinação da toxicidade do produto químico em estudo.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Material e aparelhagem

14. Todos os equipamentos que entram em contacto com os meios de ensaio devem ser de vidro ou de outro material quimicamente inerte. O material de vidro utilizado para culturas e ensaios deve ser limpo de quaisquer contaminantes químicos que possam passar para o meio de ensaio e deve ser esterilizado. Os recipientes de ensaio devem ser suficientemente largos para que as frondes das diversas colónias dos recipientes de controlo possam crescer sem se sobreporem, até ao final do ensaio. O facto de as raízes tocarem o fundo dos recipientes de ensaio não tem importância, mas são aconselháveis recipientes com a profundidade mínima de 20 mm e o volume

▼M6

mínimo de 100 ml. A escolha dos recipientes de ensaio não constitui um ponto crítico, desde que se verifiquem os requisitos atrás referidos. O ensaio já foi realizado com sucesso em frascos de vidro, placas de cristalização ou placas de Petri de dimensões apropriadas. Os recipientes de ensaio devem ser cobertos, de modo a minimizar a evaporação e a contaminação acidental, sem pôr em causa as necessárias trocas de ar. Os recipientes de ensaio mais indicados (e, em especial, as respetivas coberturas) não devem induzir zonas de sombra ou alterações das características do espetro luminoso.

15. As culturas e os recipientes de ensaio não devem ser conservados juntos. Para tal, o melhor será utilizar câmaras de crescimento, incubadoras ou mesmo salas, separadas. A iluminação e a temperatura devem ser controláveis e mantidas a um nível constante (ver pontos 35 e 36).

Organismo de ensaio

16. O presente ensaio pode ser realizado com *Lemna gibba* ou com *Lemna minor*. O apêndice 2 apresenta uma breve descrição das espécies de lentilha-d'água que já foram utilizadas em ensaios de toxicidade. O material vegetal pode ser obtido junto de uma coleção de culturas, de outro laboratório ou no campo. Se forem colhidas no campo, as plantas devem ser mantidas em cultura, durante pelo menos oito semanas, no mesmo meio que irá ser utilizado para o ensaio. Os locais onde, no campo, se faz a colheita de culturas de arranque devem estar isentos de fontes evidentes de poluição. Caso sejam obtidas de outro laboratório ou de uma coleção de culturas, as plantas devem ser mantidas da mesma forma durante, pelo menos, três semanas. Deve ser sempre indicada a origem do material vegetal e da espécie ou clone (se conhecido) utilizado para o ensaio.

17. Devem utilizar-se monoculturas visivelmente isentas de contaminação por outros organismos, como algas ou protozoários. As plantas saudáveis de *L. minor* são formadas por colónias com duas a cinco frondes, enquanto as colónias saudáveis de *L. gibba* podem apresentar até sete frondes.

18. A qualidade e a uniformidade das plantas utilizadas para o ensaio terão influência significativa no resultado, pelo que as plantas devem ser selecionadas cuidadosamente. Devem utilizar-se plantas jovens, de crescimento rápido e sem lesões ou descoloração (clorose) visíveis. Uma cultura de boa qualidade é caracterizada por uma elevada incidência de colónias com pelo menos duas frondes. Um número elevado de frondes isoladas é indicativo de *stress* ambiental, nomeadamente por limitação de nutrientes, pelo que o material vegetal das culturas com essas características não deve ser utilizado para os ensaios.

Cultura

19. Para reduzir a frequência da manutenção das culturas (por exemplo, durante os períodos em que não se prevejam ensaios com *Lemna*), as culturas podem ser conservadas em ambiente escuro e a baixa temperatura (4-10 °C). O apêndice 3 apresenta mais informações sobre as técnicas de cultura. O surgimento de sinais evidentes de contaminação por algas ou por outros organismos pode exigir a esterilização superficial de uma subamostra de frondes de *Lemna*, seguida de transferência para meio fresco (ver apêndice 3). Nesse caso, deve descartar-se a parte restante da cultura contaminada.

20. Pelo menos sete dias antes do ensaio, transfere-se um número suficiente de colónias, em condições asséticas, para meio fresco esterilizado, cultivado durante 7-10 dias nas condições do ensaio.

Meio de ensaio

21. Há vários meios recomendados para as culturas de *Lemna minor* e *Lemna gibba*, como se descreve a seguir. A inclusão de um tampão de pH no meio de ensaio [MOPS (ácido 4-morfolinopropanossulfónico, N.º CAS: 1132-61-2) no meio de ensaio de *L. minor* ou $NaHCO_3$ no meio de ensaio de *L. gibba*] deve ser cuidadosamente ponderada nos casos em que esse tampão possa interagir com o produto químico em estudo e influenciar a expressão da sua toxicidade. Também se pode utilizar o meio de Steinberg (9), desde que se verifiquem os critérios de validade do ensaio.

▼M6

22. Para as culturas e ensaios com *L. minor*, recomenda-se o meio de cultura, modificado, da norma sueca (SIS) para *Lemna*. A composição desse meio é dada no apêndice 4.

23. Para as culturas e ensaios com *L. gibba*, recomenda-se o meio de cultura 20X — AAP, descrito no apêndice 4.

24. O meio de Steinberg, descrito no apêndice 4, também é indicado para *L. minor*, mas pode ser utilizado para *L. gibba*, desde que se verifiquem os critérios de validade do ensaio.

Soluções utilizadas nos ensaios

25. As soluções de ensaio são geralmente preparadas por diluição de soluções de reserva. As soluções de reserva do produto químico em estudo são normalmente preparadas por dissolução do produto em meio de cultura.

26. A concentração mais elevada do produto químico em estudo no ensaio não deve normalmente ser superior ao limite de hidrossolubilidade do produto, nas condições de ensaio. No entanto, cabe aqui notar que as *Lemna* spp. flutuam à superfície, podendo ser expostas a produtos químicos recolhidos na interface água-ar (por exemplo, produtos químicos de baixa hidrossolubilidade, hidrófobos ou tensioativos). Nessas circunstâncias, ocorre uma exposição a materiais diferentes dos que se encontram em solução e, consoante as características do produto químico em estudo, as concentrações de ensaio podem exceder o limite de hidrossolubilidade. No caso de produtos químicos com baixa hidrossolubilidade, poderá ser necessário preparar uma solução de reserva concentrada ou dispersar o produto por meio de um dispersante ou solvente orgânico, de modo a facilitar a adição de quantidades exatas do produto químico ao meio de ensaio e as suas dispersão e dissolução. Devem ser feitos todos os esforços para evitar utilizar materiais desse tipo. A utilização de dispersantes ou solventes auxiliares não pode acarretar qualquer fitotoxicidade. A acetona e a dimetilformamida, por exemplo, incluem-se entre os solventes mais comuns que não causam fitotoxicidade em concentrações até 100 µl/l. Se se utilizar um dispersante ou um solvente, deve especificar-se a sua concentração final, tão baixa quanto possível (≤ 100 µl/l), e todos os recipientes de exposição e de controlo devem ser expostos à mesma concentração de dispersante ou solvente. Para mais orientações sobre a utilização de dispersantes, consultar a referência bibliográfica (8).

Grupos de ensaio e de controlo

27. O conhecimento prévio da toxicidade do produto químico em estudo para as *Lemna* (por exemplo, determinada com base nos resultados de ensaios de determinação da gama de concentrações) permite uma mais fácil escolha das concentrações a utilizar no ensaio. No ensaio de toxicidade definitivo, devem, geralmente, estudar-se cinco concentrações, em progressão geométrica. De preferência, o fator de separação entre as concentrações de ensaio não deve ultrapassar 3,2, mas pode utilizar-se um valor mais elevado se a curva de concentração-resposta for pouco pronunciada. Deve apresentar-se uma justificação se se utilizarem menos de cinco concentrações. Devem utilizar-se, pelo menos, três replicados de cada concentração de ensaio.

28. Para efeitos da definição da gama de concentrações (tanto nos ensaios de determinação da gama como nos ensaios definitivos de toxicidade), deve ser tido em conta o seguinte:

— Para a determinação de uma EC_x, as concentrações de ensaio devem abranger o valor da EC_x, de modo a garantir um nível de confiança apropriado. Por exemplo, para a determinação da EC_{50}, a concentração de ensaio mais elevada deve ser superior ao valor de EC_{50}. Se o valor de EC_{50} se situar fora da gama de concentrações ensaiadas, os intervalos de confiança associados serão maiores, o que poderá impossibilitar o ajustamento de um modelo estatístico.

— Se o objetivo for a determinação da LOEC ou da NOEC, a concentração mais baixa ensaiada deve ser suficientemente baixa para que o crescimento não seja significativamente inferior ao dos controlos. Por outro lado, a concentração mais elevada a ensaiar deve ser suficientemente alta para que o crescimento seja significativamente inferior ao do controlo.

▼M6

De outro modo, o ensaio terá de ser repetido com uma gama de concentrações diferente (exceto se a concentração máxima já se encontrar perto do limite de solubilidade ou da concentração máxima pretendida: por exemplo, 100 mg/l).

29. Todos os ensaios devem incluir controlos que contenham o mesmo meio nutriente e o mesmo número de frondes e colónias e que estejam sujeitos às mesmas condições ambientais e procedimentos que os recipientes de ensaio, mas sem adição do produto químico em estudo. Se se utilizar um dispersante ou solvente auxiliar, o ensaio deve incluir um controlo suplementar, com a mesma concentração de solvente/dispersante que os recipientes com o produto químico em estudo. O número de recipientes com os replicados dos controlos (e de recipientes com solvente, se for caso disso) deve ser pelo menos igual ao número de recipientes utilizados para cada concentração de ensaio e, idealmente, o dobro deste número.

30. Caso não seja necessário determinar a NOEC, o ensaio pode ser alterado de modo a aumentar o número de concentrações estudadas e a reduzir o número de replicados por concentração. Contudo, o número de replicados dos controlos não deve ser inferior a três.

Exposição

31. As colónias, com 2 a 4 frondes visíveis, são transferidas da cultura de inóculo e distribuídas de forma aleatória pelos recipientes de ensaio, em condições asséticas. Cada recipiente de ensaio deve ser inoculado com um total de 9 a 12 frondes. O número de frondes e de colónias deve ser o mesmo em todos os recipientes de ensaio. A experiência já obtida com o presente método e os dados dos estudos interlaboratoriais comparativos indicam que a utilização de três replicados de cada concentração em estudo, inicialmente com 9 a 12 frondes em cada replicado, é suficiente para detetar diferenças de crescimento da ordem de 4 a 7 %, para a inibição calculada a partir da taxa de crescimento (10 a 15 % a partir do rendimento), entre as diferentes concentrações (7).

32. É necessário colocar os recipientes de ensaio na incubadora de forma aleatória, para reduzir ao mínimo a influência das diferenças espaciais em termos de intensidade da luz ou de temperatura. É igualmente necessário mudar a posição dos recipientes, por blocos ou de forma aleatória, após as amostragens (ou mais frequentemente).

33. Se um ensaio preliminar de estabilidade mostrar que, no período de ensaio (7 dias), a concentração do produto químico em estudo não pode ser mantida (ou seja, se a concentração medida diminuir mais de 80 % em relação à concentração inicial medida), recomenda-se a utilização de um regime de ensaio semiestático. Nesse caso, as colónias devem ser expostas a soluções frescas de ensaio e de controlo em, pelo menos, duas ocasiões durante o ensaio (por exemplo, nos dias 3 e 5). A frequência da exposição ao meio fresco dependerá da estabilidade do produto químico em estudo; poderá ser necessária uma frequência maior para manter quase constantes as concentrações de substâncias altamente instáveis ou voláteis. Em certos casos, poderá ser necessário utilizar um procedimento em contínuo (8) (10).

34. A possibilidade de exposição através de aplicação foliar (aspersão) não está prevista no presente método de ensaio; para essa alternativa, ver a referência bibliográfica (11).

Condições de incubação

35. Deve utilizar-se uma iluminação fluorescente constante com luz branca, quente ou fria, de modo a proporcionar às culturas uma intensidade luminosa selecionada na gama 85-135 $\mu E \cdot m^{-2}s^{-1}$, medida num comprimento de onda da fotossíntese (400-700 nm) em pontos que se encontrem à mesma distância da fonte luminosa que as frondes de *Lemna* (intensidade equivalente a 6 500--10 000 lux). As diferenças em relação à intensidade luminosa escolhida não devem ultrapassar, em toda a zona de ensaio, ± 15 %. O método de deteção e medição da luz e, em particular, o tipo de sensor utilizado afetarão o valor

▼M6

medido. Os sensores esféricos (que respondem à luz proveniente de todos os ângulos acima e abaixo do plano de medição) e os sensores «de cosseno» (que respondem à luz proveniente de todos os ângulos acima do plano de medição) são preferíveis aos sensores unidirecionais e dão leituras mais elevadas para as fontes múltiplas de luz do tipo aqui descrito.

36. A temperatura dos recipientes de ensaio deve ser mantida a 24 ± 2 °C. O pH do meio de controlo não deve aumentar mais de 1,5 unidades durante o ensaio. No entanto, um desvio superior a 1,5 unidades de pH não invalida o ensaio quando se possa demonstrar que os critérios de validade são cumpridos. Em certos casos, como, por exemplo, nos ensaios com produtos químicos instáveis ou metais, poderá ser necessário adotar cuidados suplementares quanto à variação de pH. Para mais informações, consultar a referência bibliográfica (8).

Duração

37. O ensaio termina 7 dias depois de as plantas terem sido transferidas para os recipientes de ensaio.

Medições e determinações analíticas

38. No início do ensaio, regista-se o número de frondes em cada recipiente, tendo o cuidado de contar as frondes proeminentes e distintamente visíveis. O número de frondes que apresentam aparência normal e anormal deve ser determinado no início do ensaio e, pelo menos, mais uma vez a cada 3 dias durante o período de exposição (ou seja, pelo menos duas vezes ao longo dos 7 dias do ensaio), bem como no final do ensaio. Deve registar-se qualquer alteração no desenvolvimento das plantas: por exemplo, no que respeita a dimensão e aparência das frondes, indicações de necrose, clorose ou formação de gibas, desagregação ou perda de flutuabilidade das colónias ou dimensão e aspeto das raízes. As características mais significativas do meio de ensaio (por exemplo, presença de materiais em suspensão, crescimento de algas nos recipientes de ensaio) devem também ser registadas.

39. Para além da determinação do número de frondes durante o ensaio, devem também ser avaliados os efeitos do produto químico em estudo sobre uma (ou mais) das seguintes variáveis de medição:

i) superfície total das frondes,

ii) peso seco,

iii) peso fresco.

40. A superfície total das frondes, enquanto variável, tem a vantagem de poder ser determinada para cada recipiente de ensaio e de controlo no início, durante e no final do ensaio. O peso seco ou fresco deve ser determinado no início do ensaio a partir de uma amostra da cultura de inóculo, representativa do inóculo utilizado para lançar o ensaio, e no final do mesmo, com o material retirado das plantas de cada recipiente de ensaio e de controlo. Se a superfície das frondes não for medida, o seguimento do peso seco é preferível ao do peso fresco.

41. A área total das frondes, o peso seco e o peso fresco podem ser determinados do seguinte modo:

i) *Superfície total das frondes:* a superfície total das frondes de todas as colónias pode ser determinada por análise visual. Filma-se uma silhueta do recipiente e das plantas de ensaio com uma câmara de vídeo (colocando o recipiente numa mesa de luz) e digitaliza-se a imagem obtida. A partir de uma calibração que utilize formas planas com superfície conhecida, pode ser determinada a superfície total das frondes em cada recipiente de ensaio. Deve ter-se o cuidado de excluir a interferência causada pela borda do recipiente de ensaio. Uma abordagem alternativa, mais trabalhosa, consiste em fotografar os recipientes e plantas de ensaio, recortando depois a resultante silhueta das colónias e determinando a área da respetiva superfície por meio de um integrador ou de papel milimétrico. Podem também revelar-se apropriadas outras técnicas (por exemplo, a relação entre o peso da superfície de papel equivalente à silhueta das colónias e o peso de uma superfície de papel unitária).

▼**M6**

ii) *Peso seco:* Recolhem-se as colónias de cada recipiente de ensaio e lavam-se com água destilada ou desionizada. Retira-se-lhes a água em excesso e secam-se a 60 °C até obter um peso constante. Os fragmentos de raízes que se encontrem presentes também devem ser incluídos. O peso seco deve ser expresso com uma precisão mínima de 0,1 mg.

iii) *Peso fresco:* Transferem-se as colónias para tubos de poliestireno (ou de outro material inerte) de peso conhecido e com pequenos orifícios (de 1 mm) no fundo. Os tubos são depois centrifugados a 3 000 rpm durante 10 minutos, à temperatura ambiente. Os tubos com as colónias, agora secas, voltam a ser pesados, sendo o peso fresco calculado por subtração do peso dos tubos vazios.

Frequência das medições e determinações analíticas

42. Se se utilizar um método de ensaio estático, deve medir-se o pH de cada recipiente no início e no final do ensaio. No caso dos ensaios semiestáticos, deve medir-se o pH da solução de ensaio «fresca» antes da sua utilização, bem como o pH das correspondentes soluções «usadas».

43. A intensidade luminosa deve ser medida, na câmara de crescimento, incubadora ou sala, em pontos que estejam à mesma distância da fonte de luz que as frondes de *Lemna*. A medição deve ser efetuada pelo menos uma vez durante o ensaio. Deve registar-se diariamente a temperatura do meio contido num recipiente especialmente destinado a esse efeito e mantido nas mesmas condições na câmara de crescimento, incubadora ou sala utilizada para o ensaio.

44. Durante o ensaio, as concentrações do produto químico em estudo devem ser determinadas a intervalos adequados. Nos ensaios estáticos, a exigência mínima é que as concentrações sejam determinadas no início e no final do ensaio.

45. Nos ensaios semiestáticos em que não seja de esperar que a concentração do produto químico em estudo se mantenha no intervalo de ±20 % da concentração nominal, é necessário analisar todas as soluções de ensaio no momento em que forem preparadas e também imediatamente antes da respetiva utilização (ver ponto 33). No entanto, para os ensaios em que a concentração inicial medida do produto químico em estudo não se encontra no intervalo de ±20 % do valor nominal, mas em que se possam fornecer provas suficientes de que as concentrações iniciais são reprodutíveis e estáveis (isto é, se mantêm dentro da gama 80-120 % das concentrações iniciais), as determinações químicas podem ser limitadas às concentrações maior e menor usadas no ensaio. Em qualquer dos casos, a determinação das concentrações do produto químico em estudo antes da sua utilização só é necessária num dos recipientes replicados para cada concentração de ensaio (ou no conteúdo misturado de todos os recipientes replicados).

46. Nos ensaios em contínuo, pode ser utilizado um regime de amostragem semelhante ao descrito para os ensaios semiestáticos, com análises no início, no meio e no final do ensaio, mas, neste caso, não é adequado medir as soluções «usadas». Neste tipo de ensaio, deve verificar-se diariamente a taxa de diluição da mistura do diluente ou da solução de reserva com o produto químico em estudo.

47. Se existirem provas de que, durante o ensaio, a concentração do produto químico em estudo não variou mais de ± 20 % relativamente ao valor da concentração nominal ou da concentração inicial medida, a análise dos resultados pode basear-se nos valores nominais ou iniciais medidos. Se a variação relativamente à concentração nominal ou à concentração inicial medida for superior a ± 20 %, a análise dos resultados deve basear-se na média geométrica da concentração durante a exposição ou em modelos que descrevam a diminuição da concentração do produto químico em estudo (8).

▼M6

Ensaio do limite

48. Em determinadas circunstâncias (por exemplo, se um ensaio preliminar indicar que o produto químico em estudo não apresenta efeitos tóxicos em concentrações até 100 mg/l ou até ao seu limite de solubilidade no meio de ensaio, conforme o que seja menor), pode proceder-se a um ensaio do limite, com comparação das respostas de um grupo de controlo e de um grupo exposto ao produto químico em estudo (a uma concentração de 100 mg/l ou que corresponda ao limite de solubilidade). Recomenda-se vivamente que a ausência de toxicidade seja confirmada por análise da concentração de exposição. Todas as condições de ensaio e critérios de validade anteriormente descritos se aplicam aos ensaios do limite, exceto o facto de ser necessário utilizar o dobro do número de replicados. O crescimento dos grupos de controlo e de exposição pode ser analisado por meio de um ensaio estatístico de comparação das médias: por exemplo, o teste t de Student.

DADOS E RELATÓRIOS

Tempo de duplicação

49. Para determinar o tempo de duplicação *(T_d)* do número de frondes e verificar se o ensaio cumpre o critério de validade correspondente (ponto 12), deve aplicar-se a seguinte fórmula aos dados obtidos a partir dos recipientes de controlo:

$$T_d = \ln 2/\mu$$

onde μ é a taxa média de crescimento específico, determinada de acordo com os pontos 54 e 55.

Variáveis de resposta

50. O objetivo do ensaio consiste em determinar os efeitos do produto químico sobre o crescimento vegetativo de espécies *Lemna*. O presente método de ensaio descreve duas variáveis de resposta, já que as várias jurisdições têm preferências e necessidades regulamentares diversas. Para que os resultados dos ensaios possam ser aceitáveis em todas as jurisdições, os efeitos têm de ser avaliados por recurso a ambas as variáveis de resposta, a) e b), a seguir descritas:

a) *Taxa média de crescimento específico*: esta variável de resposta é calculada com base no aumento logarítmico do número de frondes e, adicionalmente, na evolução logarítmica de outro parâmetro de medição (área total, peso seco ou peso fresco das frondes) em função do tempo (por dia), tanto nos recipientes de controlo como nos grupos tratados com o produto químico em estudo. É por vezes designada taxa de crescimento relativa (12).

b) *Rendimento*: esta variável de resposta é calculada com base no aumento do número de frondes e, adicionalmente, na evolução de outro parâmetro de medição (área total das frondes, peso seco ou peso fresco), tanto nos recipientes de controlo como nos grupos tratados com o produto químico em estudo, até ao final do ensaio.

51. Cabe aqui notar que os valores de toxicidade calculados através destas duas variáveis de resposta não são comparáveis e que a diferença tem de ser reconhecida para efeitos da utilização dos resultados do ensaio. Se se seguirem as condições de ensaio apresentadas no presente método, os valores de EC_x baseados na taxa média de crescimento específico (E_rC_x) são geralmente mais elevados do que os resultados baseados no rendimento (E_yC_x), devido à base matemática das respetivas abordagens. Este facto não deve ser interpretado como diferença de sensibilidade entre as duas variáveis de resposta, mas simplesmente como diferença matemática entre os valores. O conceito de taxa média de crescimento específico baseia-se no padrão geral de crescimento exponencial da lentilha-d'água em culturas não sujeitas a limitações, sendo a toxicidade estimada com base nos efeitos sobre a taxa de crescimento independentemente do valor absoluto da taxa de crescimento específico dos controlos, do declive da curva de concentração-resposta ou da duração do ensaio. Em contrapartida, os resultados baseados no rendimento

▼M6

enquanto variável de resposta dependem de todas essas variáveis. O valor de E_yC_x depende da taxa de crescimento específico da espécie de lentilha-d'água utilizada em cada ensaio e da taxa máxima de crescimento específico, que pode variar consoante as espécies ou mesmo os clones. Esta variável de resposta não deve ser utilizada para comparar a sensibilidade das espécies ou mesmo dos clones de lentilha-d'água aos produtos tóxicos. Embora, do ponto de vista científico, seja preferível utilizar a taxa média de crescimento específico para estimar a toxicidade, as estimativas da toxicidade com base no rendimento foram também incluídas no presente método de ensaio para satisfazer as atuais exigências regulamentares de algumas jurisdições.

52. As estimativas da toxicidade devem basear-se no número de frondes e numa variável de medição adicional (área total, peso seco ou peso fresco das frondes), já que certos produtos químicos podem afetar outras variáveis de medição de forma muito mais severa do que o número de frondes. Esse efeito passará despercebido se o cálculo se basear exclusivamente no número de frondes.

53. O número de frondes e o valor de qualquer outra variável de resposta medida, como a área total, o peso seco ou o peso fresco das frondes, são registados numa tabela, juntamente com as concentrações do produto químico em estudo em cada momento de medição. A subsequente análise dos dados (por exemplo, para determinar a LOEC, a NOEC ou as EC_x) deve basear-se nos valores obtidos para cada replicado e não em médias calculadas para cada grupo exposto ao produto químico em estudo.

Taxa média de crescimento específico

54. A taxa média de crescimento específico num determinado período é calculada como o aumento logarítmico das variáveis de crescimento — número de frondes e outra variável de medição (área total, peso seco ou peso fresco das frondes) — aplicando a fórmula que se segue aos valores obtidos para cada replicado dos controlos e dos recipientes expostos ao produto em estudo:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

em que:

— μ_{i-j}: taxa média de crescimento específico entre o momento i e o momento j

— N_i: variável de medição no recipiente de ensaio ou de controlo no momento i

— N_j: variável de medição no recipiente de ensaio ou de controlo no momento j

— t: período decorrido entre i e j

Para cada um dos grupos de exposição e de controlo, calcular um valor médio da taxa de crescimento, associado às respetivas estimativas da variância.

55. A taxa média de crescimento específico deve ser calculada para a totalidade do período de ensaio (na fórmula acima, «i» é o momento inicial e «j» o momento final do ensaio). Para cada uma das concentrações de ensaio e de controlo, calcular o valor médio da taxa média de crescimento específico, juntamente com as estimativas da variância. Deve também avaliar-se a taxa de crescimento em cada secção do ensaio para verificar os efeitos do produto químico durante o período de exposição (por exemplo, pela análise das curvas de crescimento após transformação logarítmica). A existência de diferenças substanciais entre as taxas de crescimento de cada secção do ensaio e a taxa média de crescimento indica um desvio relativamente à situação de crescimento exponencial constante, exigindo portanto uma análise mais pormenorizada das curvas de crescimento. Nestes casos, a abordagem mais cautelosa passa pela comparação entre as taxas de crescimento específico das culturas expostas durante o período de máxima inibição e as taxas observadas nos controlos durante o mesmo período.

56. A inibição percentual da taxa de crescimento (I_r) pode então ser calculada para cada concentração de ensaio (grupos expostos), de acordo com a seguinte fórmula:

▼M6

$$\% I_r = \frac{(\mu C - \mu T)}{\mu C} \times 100$$

em que:

— % I_r: inibição percentual da taxa média de crescimento específico

— μ_C: valor médio de μ no controlo

— μ_T: valor médio de μ no grupo exposto

Rendimento

57. Os efeitos no rendimento são determinados com base em duas variáveis de medição, o número de frondes e outra variável (área total, peso seco ou peso fresco das frondes), para cada recipiente de ensaio, no início e no final do ensaio. No que respeita ao peso seco ou ao peso fresco, a biomassa de partida é determinada com base numa amostra das frondes retirada da cultura utilizada para inocular os recipientes de ensaio (ver ponto 20). Para cada concentração de ensaio e cada controlo, calcular um valor médio de rendimento, associado às respetivas estimativas da variância. Para cada grupo exposto, a percentagem média de inibição do rendimento (%I_y) pode ser calculada do seguinte modo:

$$\% I_y = \frac{(b_c - b_T)}{b_c} \times 100$$

em que:

— % I_y: redução percentual do rendimento

— b_C: biomassa final menos biomassa inicial do grupo de controlo

— b_T: biomassa final menos biomassa inicial do grupo exposto

Representação gráfica da curva de concentração-resposta

58. Devem representar-se as curvas de concentração-resposta, que relacionam a percentagem média de inibição da variável de resposta (I_r, ou I_y, calculadas como se indica nos pontos 56 ou 57) com o logaritmo da concentração do produto químico em estudo.

Estimativa da EC_x

59. As estimativas da EC_x (por exemplo, EC_{50}) devem basear-se tanto na taxa média de crescimento específico (E_rC_x) como no rendimento (E_yC_x), devendo cada uma destas medidas, por seu turno, basear-se no número de frondes e numa variável de medição adicional (área total, peso seco ou peso fresco das frondes), já que certos produtos químicos afetam de forma diferente o número de frondes e outras variáveis de medição. Os parâmetros de toxicidade pretendidos são, portanto, quatro valores de EC_x para cada um dos níveis de inibição x calculados: E_rC_x (número de frondes); E_rC_x (área total, peso seco ou peso fresco das frondes); E_yC_x (número de frondes); e E_yC_x (área total, peso seco ou peso fresco das frondes).

Processo estatístico

60. O objetivo consiste em descrever de forma quantitativa, por análise de regressão, a relação concentração-resposta. Pode utilizar-se uma regressão linear ponderada, antecedida de uma transformação de linearização dos dados de resposta — por exemplo, para unidades probit, logit ou de Weibull (13) — mas a técnica preferida é o recurso a procedimentos de regressão não linear, que permitem lidar melhor com as inevitáveis irregularidades dos dados e com os desvios relativamente a uma boa distribuição. Nas zonas próximas da inibição nula ou total, essas irregularidades podem mesmo ser

▼M6

reforçadas pela transformação, interferindo com a análise (13). Cabe aqui notar que os métodos-padrão de análise que utilizam os transformados probit, logit ou de Weibull se destinam à análise de dados quantais (por exemplo, mortalidade ou sobrevivência), pelo que têm de ser alterados em função dos dados relativos à taxa de crescimento ou ao rendimento. Em (14) (15) (16) podem consultar-se procedimentos específicos para a determinação dos valores de EC_x a partir de dados contínuos.

61. Para cada uma das variáveis de resposta em análise, utilizar a relação concentração-resposta para estimar os valores pontuais de EC_x. Sempre que possível, devem determinar-se os limites de confiança a 95 % para cada estimativa. A adequação do ajustamento da curva estimada pelo modelo de regressão aos dados de resposta deve ser avaliada, graficamente ou por métodos estatísticos. A análise de regressão deve utilizar os valores de cada replicado e não o valor médio para cada grupo exposto.

62. Se os modelos/métodos de regressão disponíveis não forem aplicáveis aos dados existentes, as estimativas da EC_{50} e os respetivos intervalos de confiança podem também obter-se utilizando uma interpolação linear com *bootstrapping* (17).

63. Para a estimativa da LOEC e, portanto, da NOEC, é necessário comparar as médias dos recipientes expostos utilizando técnicas de análise da variância (ANOVA). A média para cada concentração deve então ser comparada com a média observada nos controlos, utilizando um método adequado de comparação múltipla ou de análise de tendências. Os testes de Dunnett ou de Williams (18) (19) (20) (21) podem ser úteis para o efeito. É necessário verificar se se cumpre o pressuposto de homogeneidade da variância das análises ANOVA. Essa verificação pode ser realizada graficamente ou por um teste formal (22). Os testes de Levene ou de Bartlett são adequados neste contexto. O problema colocado pelo incumprimento do pressuposto de homogeneidade das variâncias pode, por vezes, ser corrigido através da transformação logarítmica dos dados. Caso a heterogeneidade das variâncias seja extrema e não possa ser corrigida por transformação, deve ser considerada a possibilidade de utilizar métodos de análise das tendências como, por exemplo, o método degressivo de Jonkheere. Para mais orientações sobre a determinação da NOEC, consultar a referência (16).

64. Os dados científicos mais recentes recomendam o abandono do conceito de NOEC, que deve ser substituído pela estimativa dos valores de EC_x por regressão. Em relação ao presente ensaio com *Lemna*, não foi definido nenhum valor ideal para o x. Contudo, a gama de 10 % a 20 % afigura-se adequada (em função da variável de resposta escolhida), devendo ser comunicados, de preferência, tanto os valores de EC_{10} como de EC_{20}.

Relatório

65. O relatório do ensaio deve incluir as seguintes informações:

Produto químico em estudo:

— natureza física e propriedades físico-químicas, incluindo o limite de hidrossolubilidade;

— dados de identificação química (por exemplo, número CAS) e grau de pureza (eventual presença de impurezas).

Espécies sujeitas a ensaio:

— nome científico, clone (se for conhecido) e fonte.

Condições de realização dos ensaios:

— procedimento de ensaio utilizado (estático, semiestático ou contínuo);

— data de início do ensaio e respetiva duração;

— meio de ensaio;

— descrição do método experimental: recipientes e coberturas utilizados no ensaio, volumes das soluções, número de colónias e de frondes em cada recipiente de ensaio, no início do mesmo;

— concentrações de ensaio (nominais ou medidas, conforme o caso) e número de replicados por concentração;

▼M6

— métodos de preparação das soluções de reserva e de ensaio, incluindo a eventual utilização de solventes ou dispersantes;

— temperatura durante o ensaio;

— fonte luminosa, intensidade e homogeneidade da luz;

— valores de pH dos meios de controlo e de ensaio;

— concentrações do produto químico em estudo e respetivo método de análise, juntamente com os dados adequados à avaliação da qualidade do método (estudos de validação, desvios-padrão ou limites de confiança das análises);

— métodos utilizados para a determinação do número de frondes ou de outras variáveis de medição, como o peso seco, o peso fresco ou a superfície das frondes;

— todos os desvios em relação ao presente método de ensaio.

Resultados:

— dados brutos: número de frondes e outras variáveis de medição em cada recipiente de ensaio e de controlo, para cada momento de amostragem, e momento de realização da análise;

— médias e desvios-padrão para cada variável de medição;

— curvas de crescimento para cada concentração (recomenda-se a transformação logarítmica da variável de medição — ver ponto 55);

— tempo de duplicação/ taxa de crescimento dos controlos, com base no número de frondes;

— variáveis de resposta calculadas para cada replicado exposto, com os respetivos valores médios, e coeficiente de variação dos replicados;

— representação gráfica da relação concentração/efeito;

— estimativas de parâmetros de toxicidade para as variáveis de resposta (por exemplo, EC_{50}, EC_{10}, EC_{20}) e os intervalos de confiança associados. Se forem calculados, valores da LOEC e/ou da NOEC e métodos estatísticos utilizados para a respetiva determinação;

— caso tenha sido efetuada uma análise ANOVA, dimensão do efeito detetado (por exemplo, diferenças menos significativas);

— estimulação do crescimento eventualmente verificada em qualquer dos grupos expostos;

— sinais visuais de fitotoxicidade, bem como quaisquer observações em relação às soluções de ensaio;

— discussão dos resultados, incluindo qualquer influência nos resultados do ensaio decorrente de alterações do presente método de ensaio.

REFERÊNCIAS

(1) ASTM International. (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E 1415-91 (Reapproved 1998). pp. 733-742. In, Annual Book of ASTM Standards, Vol. 11.05 Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides, ASTM, West Conshohocken, PA.

(2) US EPA — United States Environmental Protection Agency. (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., «Public draft». EPA 712-C-96-156. 8pp.

(3) AFNOR — Association Française de Normalisation. (1996). XP T 90-337: Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10pp.

(4) SSI — Swedish Standards Institute. (1995). Water quality — Determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor*, duckweed. SS 02 82 13. 15pp. (in Swedish).

▼M6

(5) Environment Canada. (1999). Biological Test Method: Test for Measuring the Inhibition of Growth Using the Freshwater Macrophyte, *Lemna minor*. EPS 1/RM/37 — 120 pp.

(6) Environment Canada. (1993) Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides: Non-Target Plant Testing and Evaluation. Canadian Wildlife Service, Technical Report Series No. 145.

(7) Sims I., Whitehouse P. & Lacey R. (1999) The OECD *Lemna* Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc — Environment Agency.

(8) OCDE (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.23. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

(9) Organização Internacional de Normalização. ISO DIS 20079. Water Quality — Determination of the Toxic Effect of Water Constituents and Waste Water to Duckweed (*Lemna minor*) — Duckweed Growth Inhibition Test.

(10) Walbridge C. T. (1977). A flow-through testing procedure with duckweed (*Lemna minor* L.). Environmental Research Laboratory — Duluth, Minnesota 55804. US EPA Report No. EPA-600/3-77 108. September 1977.

(11) Lockhart W. L., Billeck B. N. & Baron C. L. (1989). Bioassays with a floating plant (*Lemna minor*) for effects of sprayed and dissolved glyphosate. *Hydrobiologia*, 118/119, 353-359.

(12) Huebert, D. B. & Shay J.M. (1993) Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12, 481-483.

(13) Christensen, E.R.,, Nyholm, N. (1984): Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. *Env. Sci. Technol*. 19, 713-718.

(14) Nyholm, N. Sørensen, P.S., Kusk, K.O. & Christensen, E.R. (1992): Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem*. 11, 157-167.

(15) Bruce R.D. & Versteeg D.J. (1992) A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 11, 1485-1494.

(16) OCDE (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: *A guidance to application*. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

(17) Norberg-King T.J. (1988) An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. US EPA, Duluth, MN.

(18) Dunnett, C.W. (1955) A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, 1096-1121.

(19) Dunnett, C.W. (1964) New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, 482-491.

(20) Williams, D.A. (1971) A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics, 27: 103-117.

(21) Williams, D.A. (1972) The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28: 519-531.

(22) Brain P. & Cousens R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Research*, 29, 93-96.

▼M6

Apêndice 1

Definições

Para efeitos do presente método de ensaio, utilizam-se as seguintes definições e abreviaturas:

Biomassa: peso seco da matéria viva presente numa população. No presente ensaio, utilizam-se algumas formas alternativas de medição da biomassa, como o número ou a área das frondes, sendo o termo «biomassa» utilizado também para essas medições alternativas.

Produto químico: substância ou mistura.

Clorose: amarelecimento do tecido das frondes.

Clone: organismo ou célula obtido a partir de um único indivíduo por reprodução assexuada. Os indivíduos de um mesmo clone são, portanto, geneticamente idênticos.

Colónia: agregado de frondes (geralmente 2 a 4) progenitoras e descendentes, ligadas entre si. As colónias são por vezes designadas por «planta».

EC_x: concentração do produto químico em estudo que, dissolvida no meio de ensaio, resulta numa redução de x % (por exemplo, 50 %) do crescimento da *Lemna*, após um determinado período de exposição (que deve ser explicitamente mencionado nos casos em que se afaste da duração total ou normal do ensaio). A fim de indicar de forma inequívoca se o valor de EC se refere à taxa de crescimento ou ao rendimento, utiliza-se o símbolo «E_rC» no primeiro caso e o símbolo «E_yC» no segundo, seguidos da designação da variável de medição utilizada: por exemplo, E_rC (número de frondes).

Ensaio em contínuo: ensaio em que a solução em estudo é continuamente substituída.

Fronde: estrutura individual/única, em forma de «folha», de um espécime de lentilha-d'água. Trata-se da menor unidade, ou seja, indivíduo, capaz de reprodução.

Giba: fronde que apresenta um aspeto irregular ou inchado.

Crescimento: aumento da variável de medição, que pode ser o número, o peso seco, o peso húmido ou a área das frondes, ao longo do período de ensaio.

Taxa de crescimento (taxa média de crescimento específico): aumento logarítmico da biomassa durante o período de exposição.

Menor concentração com efeito observável (LOEC): concentração mais baixa à qual se observa que o produto químico em estudo tem um efeito estatisticamente significativo ($p < 0,05$) de redução do crescimento, quando comparada com o controlo, para um determinado período de exposição. No entanto, todas as concentrações de ensaio superiores à LOEC devem ter um efeito prejudicial igual ou superior ao verificado com a LOEC. Se estas duas condições não puderem ser satisfeitas, deve fornecer-se uma explicação circunstanciada sobre a forma como se determinou a LOEC (e, consequentemente, a NOEC).

Variável de medição: qualquer tipo de variável que seja medida para permitir a determinação do ponto final do ensaio, utilizando uma ou mais variáveis de resposta. No presente método, o número, a área, o peso fresco e o peso seco das frondes são variáveis de medição.

Monocultura: cultura com uma única espécie de planta.

Necrose: tecido de fronde morto (ou seja, branco ou empapado em água).

Concentração sem efeitos observáveis (NOEC): concentração de ensaio imediatamente inferior à LOEC.

Fenótipo: características observáveis de um organismo, determinadas pela interação dos seus genes com o ambiente em que vive.

Variáveis de resposta: variáveis de estimação da toxicidade, derivadas de qualquer dos parâmetros medidos que descrevem a biomassa nos diferentes métodos de cálculo. No presente método, as taxas de crescimento e o rendimento são variáveis de resposta derivadas de variáveis de medição como o número, a área, o peso fresco ou o peso seco das frondes.

▼M6

Ensaio semiestático (com renovação): ensaio em que a solução de ensaio é periodicamente substituída, em momentos específicos do ensaio.

Ensaio estático: método de ensaio durante o qual não há renovação da solução de ensaio.

Produto químico em estudo: qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado o presente método de ensaio.

Ponto final do ensaio: descreve, em termos gerais, o fator que será alterado pelo produto químico em estudo, por comparação com o controlo, e cuja identificação é o objetivo do ensaio. No presente método, o ponto final é a inibição do crescimento, que pode ser expressa por diferentes variáveis de resposta, baseadas em uma ou mais variáveis de medição.

Meio de ensaio: meio sintético completo de crescimento em que as plantas de ensaio são cultivadas quando expostas ao produto químico em estudo. Em geral, o produto químico em estudo é dissolvido no meio de ensaio.

Rendimento: valor de uma variável de medição que exprime a diferença entre a biomassa no final do período de exposição e o valor dessa variável de medição no início do período de exposição.

▼M6

Apêndice 2

Descrição de *Lemna* spp.

A planta aquática que tem o nome comum de lentilha-d'água, *Lemna* spp., pertence à família Lemnaceae, composta por quatro géneros, com espécies distribuídas por todo o mundo. As suas diferentes formas e taxonomia já foram descritas de forma exaustiva (1) (2). A *Lemna gibba* e a *L. minor* são espécies representativas das zonas temperadas, muito utilizadas em ensaios de toxicidade. Ambas as espécies apresentam um caule discoide (fronde), flutuante ou submerso, e uma raiz muito fina que parte do centro da face inferior de cada fronde. As *Lemna* spp. raramente produzem flores, sendo a reprodução garantida pela produção vegetativa de novas frondes (3). Em comparação com as mais velhas, as plantas jovens tendem a ser mais claras, com raízes mais curtas, e são constituídas por duas ou três frondes de tamanhos diferentes. O pequeno tamanho, a estrutura simples, a reprodução assexuada e o curto tempo de duplicação das *Lemna* fazem com que estas plantas sejam muito utilizadas em ensaios de laboratório (4) (5).

Devido a variações de sensibilidade, provavelmente interespecíficas, só são válidas as comparações de sensibilidade no seio de uma mesma espécie.

Exemplos de espécies de *Lemna* que já foram utilizadas em ensaios laboratoriais: referências das espécies

Lemna aequinoctialis: Eklund, B. (1996). The use of the red alga *Ceramium strictum* and the duckweed *Lemna aequinoctialis* in aquatic ecotoxicological bioassays. Licentiate in Philosophy Thesis 1996:2. Dep. of Systems Ecology, Stockholm University.

Lemna major: Clark, N. A. (1925). The rate of reproduction of *Lemna major* as a function of intensity and duration of light. J. phys. Chem., 29: 935-941.

Lemna minor: United States Environmental Protection Agency (US EPA). (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., «Public draft». EPA 712-C-96-156. 8pp.

Association Française de Normalisation (AFNOR). (1996). XP T 90-337: Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10pp.

Swedish Standards Institute (SIS). (1995). Water quality — Determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor*, duckweed. SS 02 82 13. 15pp. (in Swedish).

Lemna gibba: ASTM International. (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E 1415-91 (Reapproved 1998). pp. 733--742.

United States Environmental Protection Agency (US EPA). (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., «Public draft». EPA 712-C-96-156. 8pp.

Lemna paucicostata: Nasu, Y., Kugimoto, M. (1981). *Lemna* (duckweed) as an indicator of water pollution. I. The sensitivity of *Lemna paucicostata* to heavy metals. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 10:1959-1969.

Lemna perpusilla: Clark, J. R. et al. (1981). Accumulation and depuration of metals by duckweed (*Lemna perpusilla)*. Ecotoxicol. Environ. Saf., 5:87-96.

Lemna trisulca: Huebert, D. B., Shay, J. M. (1993). Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. Environ. Toxicol. and Chem., 12:481- 483.

Lemna valdiviana: Hutchinson, T.C., Czyrska, H. (1975). Heavy metal toxicity and synergism to floating aquatic weeds. Verh.-Int. Ver. Limnol., 19:2102-2111.

Fontes de espécies do género *Lemna*

University of Toronto Culture Collection of Algae and Cyanobacteria
Department of Botany, University of Toronto
Toronto, Ontario, CANADA, M5S 3 B2
Tel: +1-416-978-3641
Fax:+1-416-978-5878
e-mail: jacreman@botany.utoronto.ca

▼**M6**

North Carolina State University
Forestry Dept
Duckweed Culture Collection
Campus Box 8002
Raleigh, NC 27695-8002
UNITED STATES
phone 001 (919) 515-7572
astomp@unity.ncsu.edu

Institute of Applied Environmental Research (ITM) Stockholm University
SE-106 91
STOCKHOLM
SWEDEN
Tel: +46 8 674 7240
Fax +46 8 674 7636

Federal Environmental Agency (UBA)
FG III 3.4
Schichauweg 58
12307 Berlin
GERMANY
e-mail: lemna@uba.de

REFERÊNCIAS

(1) Hillman, W.S. (1961). The Lemnaceae or duckweeds: A review of the descriptive and experimental literature. The Botanical Review, 27:221-287.

(2) Landolt, E. (1986). Biosystematic investigations in the family of duckweed (*Lemnaceae*). Vol. 2. Geobotanischen Inst. ETH, Stiftung Rubel, Zürich, Switzerland.

(3) Björndahl, G. (1982). Growth performance, nutrient uptake and human utilization of duckweeds *(Lemnaceae* family). ISBN 82-991150-0-0. The Agricultural Research Council of Norway, University of Oslo.

(4) Wang, W. (1986). Toxicity tests of aquatic pollutants by using common duckweed. Environmental Pollution, Ser B, 11:1-14.

(5) Wang, W. (1990). Literature review on duckweed toxicity testing. Environmental Research, 52:7-22.

▼M6

Apêndice 3

Conservação das culturas de reserva

As culturas de reserva podem ser conservadas a baixa temperatura (4-10 °C) por longos períodos, sem que seja necessário proceder à sua transferência periódica. O meio de cultura da *Lemna* pode ser o mesmo que é utilizado para os ensaios, mas as culturas de reserva também podem ser conservadas noutros meios nutrientes enriquecidos.

Periodicamente, várias plantas jovens, verdes claras, são removidas e novamente cultivadas, através de uma técnica assética, em recipientes com meio fresco. Nas condições de baixa temperatura sugeridas no presente método, a transferência das culturas pode ser feita a intervalos até três meses.

Devem utilizar-se recipientes de cultura quimicamente limpos (lavados com ácido) e estéreis e técnicas de manuseamento em condições de assepsia. Em caso de contaminação da cultura de reserva (por exemplo, por algas ou fungos), é necessário tomar medidas para eliminar os organismos contaminantes. No caso das algas e da maior parte dos restantes organismos contaminantes, isso será possível por esterilização superficial. Retira-se uma amostra da planta contaminada e cortam-se as raízes. O material é em seguida vigorosamente agitado em água limpa e mergulhado numa solução a 0,5 % (v/v) de hipoclorito de sódio por um período de 30 segundos a 5 minutos. O material vegetal é depois lavado com água esterilizada e transferido para uma série de recipientes de cultura com meio de cultura fresco. Muitas frondes acabam por morrer devido a este tratamento, principalmente se os períodos de exposição forem mais longos, mas algumas sobrevivem e ficam normalmente isentas de contaminação. As frondes sobreviventes podem então ser utilizadas para reinocular novas culturas.

▼M6

Apêndice 4

Meios

Existem diversos meios de cultura recomendados para *L. minor* e *L. gibba*. Para a *L. minor*, o meio recomendado é o *Swedish Standard* (SIS) modificado, enquanto para a *L. gibba* o meio recomendado é o 20X AAP. A composição de ambos os meios é apresentada a seguir. Para a preparação destes meios, devem utilizar-se reagentes e produtos químicos de qualidade analítica e água desionizada.

Meio de crescimento *Swedish Standard* (SIS) para *Lemna*

— As soluções de reserva I a V são esterilizadas em autoclave (120 °C, 15 minutos) ou por filtração através de membrana (aproximadamente 0,2 μm de diâmetro de poro).

— As soluções VI e (opcionalmente) VII são esterilizadas exclusivamente por filtração através de membrana; estas soluções não devem ser esterilizadas em autoclave,

— As soluções de reserva esterilizadas devem ser armazenadas em local fresco e ao abrigo da luz. As soluções I a V devem ser descartadas ao fim de seis meses, enquanto as soluções VI e (opcionalmente) VII têm um período de conservação de um mês.

Solução de reserva n.º	Substância	Concentração na solução de reserva (g/l)	Concentração no meio preparado (mg/·l)	Meio preparado	
				Elemento	Concentração (mg/·l)
I	$NaNO_3$	8,50	85	Na; N	32; 14
	KH_2PO_4	1,34	13,4	K; P	6,0; 2,4
II	$MgSO_4 . 7H_2O$	15	75	Mg; S	7,4; 9,8
III	$CaCl_2 . 2H_2O$	7,2	36	Ca; Cl	9,8; 17,5
IV	Na_2CO_3	4,0	20	C	2,3
V	H_3BO_3	1,0	1,00	B	0,17
	$MnCl_2 . 4H_2O$	0,20	0,20	Mn	0,056
	$Na_2MoO_4 . 2H_2O$	0,010	0,010	Mo	0,0040
	$ZnSO_4 . 7H_2O$	0,050	0,050	Zn	0,011
	$CuSO_4 . 5H_2O$	0,0050	0,0050	Cu	0,0013
	$Co(NO_3)_2 . 6H_2O$	0,010	0,010	Co	0,0020
VI	$FeCl_3 . 6H_2O$	0,17	0,84	Fe	0,17
	Na_2-EDTA $2H_2O$	0,28	1,4	—	—
VII	MOPS (tampão)	490	490	—	—

Para preparar um litro de meio SIS, adicionar o seguinte a 900 ml de água desionizada:

▼M6

— 10 ml da solução de reserva I,

— 5 ml da solução de reserva II,

— 5 ml da solução de reserva III,

— 5 ml da solução de reserva IV,

— 1 ml da solução de reserva V,

— 5 ml da solução de reserva VI,

— 1 ml da solução de reserva VII (opcional).

Nota: A solução de reserva VII (tampão MOPS) poderá ser necessária para o estudo de determinados produtos químicos (ver ponto 11).

Ajustar o pH a 6,5 ± 0,2 com HCl ou NaOH 0,1 mol ou 1,0 mol, completando o volume até 1 litro com água desionizada.

Meio de crescimento 20X–AAP

As soluções de reserva são preparadas com água esterilizada ou desionizada.

As soluções de reserva esterilizadas devem ser armazenadas em local fresco e ao abrigo da luz. Nessas condições, terão um tempo de conservação mínimo de 6 a 8 semanas.

Para o meio 20X–AAP, preparam-se cinco soluções de reserva de nutrientes (A1, A2, A3, B e C), utilizando produtos químicos de qualidade analítica. Para produzir o meio de cultura, adicionar 20 ml de cada solução de reserva de nutrientes a cerca de 850 ml de água desionizada. Ajustar o pH a 7,5 ± 0,1 com HCl ou NaOH 0,1 mol ou 1,0 mol, completando o volume até 1 litro com água desionizada. O meio assim obtido é filtrado para um recipiente esterilizado, através de uma membrana com diâmetro de poro aproximado de 0,2 μm.

O meio de cultura para os ensaios deve ser preparado com 1 ou 2 dias de antecedência, de modo a permitir a estabilização do pH. O pH do meio de cultura deve ser verificado antes da sua utilização e, se necessário, reajustado com HCl ou NaOH 0,1 mol ou 1,0 mol, como acima se descreve.

Solução de reserva n.º	Substância	Concentração na solução de reserva (g/·l) (*)	Concentração no meio preparado (mg/·l) (*)	Meio preparado	
				Elemento	Concentração (mg/·l) (*)
A1	$NaNO_3$	26	510	Na; N	190; 84
	$MgCl_2.6H_2O$	12	240	Mg	58,08
	$CaCl_2.2H_2O$	4,4	90	Ca	24,04
A2	$MgSO_4.7H_2O$	15	290	S	38,22
A3	$K_2HPO_4.3H_2.O$	1,4	30	K; P	9,4; 3,7
B	H_3BO_3	0,19	3,7	B	0,65
	$MnCl_2·4H_2O$	0,42	8,3	Mn	2,3
	$FeCl_3.6H_2O$	0,16	3,2	Fe	0,66

▼**M6**

Solução de reserva n.º	Substância	Concentração na solução de reserva (g/·l) (*)	Concentração no meio preparado (mg/·l) (*)	Meio preparado	
				Elemento	Concentração (mg/·l) (*)
	$Na_2EDTA.2H_2O$	0,30	6,0	-	-
	$ZnCl_2$	3,3 mg/l	66 µg/l	Zn	31 µg/l
	$CoCl_2.6H_2O$	1,4 mg/l	29 µg/l	Co	7,1 µg/l
	$Na_2MoO_4.2H_2O$	7,3 mg/l	145 µg/l	Mo	58 µg/l
	$CuCl_2.2H_2O$	0,012 mg/l	0,24 µg/l	Cu	0,080 µg/l
C	$NaHCO_3$	15	300	Na; C	220; 43

(*) Excepto nos casos assinalados

Nota: A concentração final teoricamente adequada de bicarbonato (que evita qualquer variação significativa do pH) é de 15 mg/l, e não de 300 mg/l. Contudo, a utilização habitual do meio 20X-AAP, nomeadamente no estudo interlaboratorial comparativo para o presente método, baseia-se numa concentração de 300 mg/l [I. Sims, P. Whitehouse e R. Lacey (1999) *The OECD* Lemna *Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc — Environment Agency*].

Meio de STEINBERG (derivado do método ISO 20079)

Concentrações e soluções de reserva

O meio de Steinberg modificado é utilizado no método ISO 20079 apenas para a *Lemna minor* (já que o método só utiliza essa espécie), mas o ensaio mostrou bons resultados também com *Lemna gibba*.

Para a preparação do meio, devem utilizar-se reagentes e produtos químicos de qualidade analítica e água desionizada.

Preparar o meio nutriente a partir das soluções de reserva ou do meio 10 vezes mais concentrado, que é a máxima concentração que se pode obter sem que ocorra precipitação.

Quadro 1

Meio de Steinberg com pH estabilizado (modificado segundo Altenburger)

Componente		Meio nutriente	
Macroelementos	Peso molar	mg/l	mmol/l
KNO_3	101,12	350,00	3,46
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	236,15	295,00	1,25
KH_2PO_4	136,09	90,00	0,66
K_2HPO_4	174,18	12,60	0,072
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246,37	100,00	0,41

▼**M6**

Microelementos	Peso molar	µg/l	µmol/l
H_3BO_3	61,83	120,00	1,94
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	287,43	180,00	0,63
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	241,92	44,00	0,18
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	197,84	180,00	0,91
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	270,21	760,00	2,81
EDTA (di-hidrato dissódico)	372,24	1 500,00	4,03

Quadro 2

Soluções de reserva (macroelementos)

1. Macroelementos (50 vezes mais concentrados)	**g/l**
Solução de reserva 1:	
KNO_3	17,50
KH_2PO_4	4,5
K_2HPO_4	0,63
Solução de reserva 2:	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	5,00
Solução de reserva 3:	
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	14,75

Quadro 3

Soluções de reserva (microelementos)

2. Microelementos (1 000 vezes mais concentrados)	**mg/l**
Solução de reserva 4:	
H_3BO_3	120,0
Solução de reserva 5:	
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	180,0
Solução de reserva 6:	
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	44,0
Solução de reserva 7:	
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	180,0
Solução de reserva 8:	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	760,00
EDTA (di-hidrato dissódico)	1 500,00

— As soluções de reserva 2 e 3 e, em separado, 4 a 7, podem ser misturadas (tomando em conta as concentrações pretendidas).

▼**M6**

— Para aumentar o período de conservação, tratar as soluções em autoclave a 121 °C durante 20 minutos ou, em alternativa, esterilizar por filtração através de membrana (0,2 μm). Para a solução de reserva 8, recomenda-se vivamente a esterilização por filtração (0,2 μm).

Preparação da concentração final do meio de STEINBERG (modificado)

— Juntar 20 ml das soluções de reserva 1, 2 e 3 (ver quadro 2) a cerca de 900 ml de água desionizada, para evitar a precipitação.

— Juntar 1,0 ml das soluções de reserva 4, 5, 6, 7 e 8 (ver quadro 3).

— O pH deve ser de 5,5 ± 0,2 (ajustar por adição de um volume tão pequeno quanto possível de solução de NaOH ou de HCl).

— Completar com água até 1 000 ml.

— Se as soluções de reserva tiverem sido esterilizadas e se utilizar uma água apropriada, não é necessário proceder a mais nenhuma esterilização. Se o meio final for esterilizado, a solução de reserva 8 deve ser acrescentada depois do tratamento em autoclave (a 121 °C durante 20 minutos).

Preparação do meio de STEINBERG (modificado) 10 vezes concentrado, para armazenamento temporário

— Juntar 20 ml das soluções de reserva 1, 2 e 3 (ver quadro 2) a cerca de 30 ml de água para evitar a precipitação.

— Juntar 1,0 ml das soluções de reserva 4, 5, 6, 7 e 8 (ver quadro 3). Completar com água até 100 ml.

— Se as soluções de reserva tiverem sido esterilizadas e se utilizar uma água apropriada, não é necessário proceder a mais nenhuma esterilização. Se o meio final for esterilizado, a solução de reserva 8 deve ser acrescentada depois do tratamento em autoclave (a 121 °C durante 20 min).

— O pH do meio (concentração final) deve ser de 5,5 ± 0,2.

▼M4

C.27. ENSAIO DE TOXICIDADE EM QUIRONOMÍDEOS NUM SISTEMA SEDIMENTOS-ÁGUA COM SEDIMENTOS ENRIQUECIDOS

INTRODUÇÃO

1. O presente método de ensaio é equivalente ao *Test Guideline* TG 218 da OCDE (2004). Foi concebido para avaliar os efeitos nas larvas dos dípteros de água doce *Chironomus* sp., que vivem nos sedimentos, de uma exposição prolongada a determinados produtos químicos. Baseia-se nos atuais protocolos de ensaios de toxicidade para as espécies *Chironomus riparius* e *Chironomus tentans* que foram desenvolvidos na Europa (1)(2)(3) e na América do Norte (4)(5)(6)(7)(8) e foram sujeitos a um ensaio interlaboratorial (1)(6)(9). Pode também utilizar-se outras espécies de quironomídeos bem documentadas, como a *Chironomus yoshimatsui* (10)(11).

2. O cenário de exposição utilizado neste método de ensaio passa pelo enriquecimento dos sedimentos na substância em estudo. A seleção do cenário de exposição adequado depende da finalidade do ensaio. A adição da substância em estudo aos sedimentos tem por objetivo simular a acumulação de produtos químicos persistentes nos sedimentos. Este sistema de exposição utiliza um sistema de ensaio sedimentos-água no qual os sedimentos foram enriquecidos no produto químico em estudo.

3. As substâncias a ensaiar com organismos que vivem nos sedimentos persistem, em geral, neste compartimento durante longos períodos. A exposição dos referidos organismos pode ter lugar por várias vias. A importância relativa de cada via de exposição, bem como o tempo de contribuição de cada uma delas para os efeitos tóxicos globais, depende das propriedades físico-químicas do produto químico em causa. No caso de substâncias fortemente adsorventes (por exemplo, com log K_{ow} > 5) ou de substâncias ligadas aos sedimentos por ligações covalentes, a ingestão de alimentos contaminados pode constituir uma via de exposição significativa. Para não subestimar a toxicidade das substâncias altamente lipófilas, pode ponderar-se a utilização de alimentos adicionados aos sedimentos antes da aplicação da substância em estudo. De forma a ter em conta todas as vias de exposição potenciais, o presente método de ensaio focaliza-se na exposição a longo prazo. A duração do ensaio é de 20 a 28 dias para *C. riparius* e *C. yoshimatsui* e de 28 a 65 dias para *C. tentans*. Se forem necessários dados a curto prazo para uma finalidade específica (por exemplo, para investigar os efeitos de um produto químico), é possível utilizar replicados adicionais, a remover após dez dias.

4. Os parâmetros medidos são o número total de indivíduos adultos emergidos e o tempo necessário para tal. Se forem necessários dados adicionais a curto prazo, recomenda-se que as determinações da sobrevivência e do crescimento das larvas apenas sejam efetuadas após um período de dez dias, recorrendo aos replicados adicionais que se justifiquem.

5. Recomenda-se a utilização de sedimentos formulados. Estes apresentam várias vantagens relativamente aos sedimentos naturais:

   — a variabilidade experimental é reduzida porque os sedimentos constituem uma matriz "normalizada" reprodutível, eliminando-se a necessidade de encontrar fontes de sedimentos limpos e não contaminados,

   — os ensaios podem ser iniciados em qualquer momento, eliminando-se assim a variabilidade sazonal dos sedimentos ensaiados, não havendo necessidade de pré-tratar os sedimentos para remover a fauna indígena; a utilização de sedimentos formulados reduz também o custo associado à colheita no terreno de quantidades suficientes de sedimentos para os ensaios de rotina,

   — a utilização de sedimentos formulados permite ainda efetuar comparações de toxicidade e classificar as substâncias em conformidade.

6. Definem-se no apêndice 1 alguns conceitos utilizados.

▼M4

PRINCÍPIO DO MÉTODO

7. São expostas larvas de quironomídeos do primeiro estádio larvar a uma gama de concentrações do produto químico em estudo em sistemas sedimentos-água. Os sedimentos são enriquecidos na substância em estudo, sendo as larvas do primeiro estádio larvar subsequentemente introduzidas em copos de ensaio nos quais as concentrações de sedimentos e da água foram estabilizadas. A emergência de quironomídeos e as respetivas taxas de desenvolvimento são medidas no final do ensaio. Se necessário, a sobrevivência e o peso das larvas podem também ser determinados decorridos 10 dias, utilizando os replicados adicionais que se justifiquem. Os dados são analisados por recurso a um modelo de regressão, de forma a estimar a concentração que causaria uma redução de x% na emergência, na sobrevivência ou no crescimento das larvas (por exemplo, CE_{15}, CE_{50}, etc.), ou utilizando hipóteses estatísticas, para determinar o NOEC/LOEC. Este último método exige a comparação de valores que produzem efeitos com valores de controlo, por recurso a testes estatísticos.

INFORMAÇÕES SOBRE A SUBSTÂNCIA EM ESTUDO

8. Devem ser conhecidas a solubilidade em água e a pressão de vapor da substância em estudo, bem como a partição nos sedimentos medida ou calculada e a estabilidade na água e nos sedimentos. Para a quantificação da substância em estudo na água sobrenadante, na água dos poros e nos sedimentos, deve dispor-se de um método analítico fiável, com exatidão e limite de deteção conhecidos e documentados. A fórmula estrutural e o grau de pureza da substância constituem igualmente informações úteis. O comportamento químico da substância em estudo (p. ex.: dissipação, degradação abiótica ou biótica, etc.) é também uma informação importante. Para mais orientações sobre o ensaio de substâncias cujas propriedades físico-químicas dificultam a realização dos ensaios, consultar a referência bibliográfica (12).

PRODUTOS QUÍMICOS DE REFERÊNCIA

9. Pode testar-se periodicamente produtos químicos de referência com o objetivo de garantir a fiabilidade do protocolo e das condições de ensaio. As seguintes substâncias constituem exemplos de substâncias tóxicas de referência utilizadas com êxito em ensaios interlaboratoriais e em estudos de validação: lindano, trifluralina, pentaclorofenol, cloreto de cádmio e cloreto de potássio (1)(2)(5)(6)(13).

VALIDADE DO ENSAIO

10. Um ensaio é considerado válido se forem cumpridas as seguintes condições:

— a emergência nos controlos deve ser de, pelo menos, 70 % no final do ensaio (1)(6),

— a emergência de indivíduos adultos das espécies *C. riparius* e *C. yoshimatsui* nos recipientes de controlo deve ocorrer 12 a 23 dias após a inserção destas espécies nos recipientes; no caso da *C. tentans*, é necessário um período de 20 a 65 dias,

— no final do ensaio, devem determinar-se o pH e a concentração de oxigénio dissolvido em cada recipiente. A concentração de oxigénio deve ser de, pelo menos, 60 % do valor da saturação com ar (VSA) à temperatura utilizada e o pH da água sobrenadante deve estar compreendido entre 6 e 9, em todos os recipientes de ensaio,

— a temperatura da água não deve variar mais de ± 1,0 °C. Esta temperatura pode ser controlada numa sala isotérmica, caso em que a temperatura ambiente deve ser confirmada a intervalos adequados.

▼M4

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Recipientes de ensaio

11. O estudo é realizado em copos de vidro de 600 ml, com 8 cm de diâmetro. Pode utilizar-se outros recipientes, devendo contudo assegurar-se uma espessura adequada da água sobrenadante e dos sedimentos. A superfície dos sedimentos deve proporcionar 2 a 3 cm^2 por cada larva. O rácio entre a espessura da camada de sedimentos e a espessura da água sobrenadante deve ser de 1:4. Os recipientes de ensaio e o restante equipamento que entre em contacto com o sistema de ensaio devem ser exclusivamente de vidro ou de outro material quimicamente inerte (p. ex. Teflon).

Seleção das espécies

12. A espécie a utilizar de preferência no ensaio é a *Chironomus riparius*. A espécie *Chironomus tentans* também é adequada, mas é mais difícil de manipular e exige um período de ensaio mais longo. Pode igualmente utilizar-se a *Chironomus yohimatsui*. O apêndice 2 apresenta informações sobre os métodos de cultura de *Chironomus riparius*. Estão também disponíveis informações sobre as condições de cultura das espécies *Chironomus tentans* (4) e *Chironomus yoshimatsui* (11). A identidade das espécies deve ser confirmada antes do ensaio, exceto no caso de organismos provenientes de uma cultura interna do laboratório.

Sedimentos

13. Devem ser utilizados, de preferência, sedimentos formulados (também chamados sedimentos reconstituídos, artificiais ou sintéticos). Contudo, se forem utilizados sedimentos naturais, estes devem ser caracterizados (pelo menos pH e teor de carbono orgânico, recomendando-se a determinação de outros parâmetros, tais como a razão C/N e a granulometria) e devem estar isentos de qualquer contaminação e de outros organismos que possam competir com os quironomídeos ou consumi-los. Recomenda-se igualmente que, antes de ser utilizados num ensaio de toxicidade em quironomídeos, os sedimentos naturais sejam acondicionados durante sete dias em condições semelhantes às do ensaio subsequente. Recomenda-se que sejam utilizados no presente ensaio (1)(15)(16) sedimentos formulados com a seguinte composição, baseada na do solo artificial utilizado no método C.8 (14):

a) 4-5 % (massa seca) de turfa: pH tão próximo quanto possível do intervalo 5,5-6,0; é importante utilizar turfa em pó, finamente moída (granulometria das partículas ≤ 1 mm), unicamente seca ao ar;

b) 20 % (massa seca) de argila caulinítica, de preferência com teor de caulinite superior a 30 %;

c) 75-76 % (massa seca) de areia quartzítica, com predominância de areia fina com mais de 50 % de partículas de granulometria compreendida entre 50 e 200 μm;

d) A quantidade de água desionizada necessária para que o teor de humidade da mistura final se situe na gama 30-50 %;

e) A quantidade de carbonato de cálcio ($CaCO_3$) quimicamente puro necessária para ajustar o pH da mistura final dos sedimentos a 7,0 ± 0,5. O teor de carbono orgânico da mistura final deve ser de 2 % ± 0,5 %, devendo ser ajustado por recurso a quantidades adequadas de turfa e areia, em conformidade com as alíneas a) e c).

14. As origens da turfa, da argila caulinítica e da areia devem ser conhecidas. Deve verificar-se a ausência de contaminação química (p. ex., metais pesados, compostos organoclorados, compostos organofosforados, etc.) nos componentes dos sedimentos. No apêndice 3, apresenta-se um exemplo de preparação de sedimentos formulados. Uma mistura de componentes secos também é aceitável caso se demonstre que, após a adição da água sobrenadante, não ocorre separação de componentes dos sedimentos (por exemplo, partículas de turfa flutuantes) e que a turfa ou os sedimentos estão suficientemente acondicionados.

▼M4

Água

15. Qualquer água com as características químicas de uma água de diluição aceitável enunciadas nos apêndices 2 e 4 é adequada para o ensaio. Para a cultura e o ensaio, pode utilizar-se qualquer água adequada, água natural (superficial ou subterrânea), água reconstituída (ver o apêndice 2) ou água da rede de abastecimento desclorada, desde que os quironomídeos nela sobrevivam durante todo o período de cultura e de ensaio sem evidenciarem sinais de *stress*. No início do ensaio, o pH da água de ensaio deve estar compreendido entre 6 e 9 e a dureza total da água, expressa em $CaCO_3$, não deve exceder 400 mg/l. No entanto, caso se suspeite de uma interação entre os iões responsáveis pela dureza e a substância em estudo, deve utilizar-se uma água de dureza inferior (nessa eventualidade, o meio Elendt M4 não pode ser utilizado). Deve utilizar-se o mesmo tipo de água em todo o estudo. As características de qualidade da água enumeradas no apêndice 4 devem ser determinadas pelo menos duas vezes por ano, ou sempre que se suspeite que tenham mudado significativamente.

Soluções-mãe — sedimentos enriquecidos

16. O enriquecimento dos sedimentos na concentração escolhida é geralmente efetuado por adição direta de uma solução da substância em estudo. Com o auxílio de um moinho de rolos ou de um misturador de alimentos, ou manualmente, adiciona-se aos sedimentos formulados uma solução-mãe da substância em estudo, dissolvida em água desionizada. Se a substância for pouco solúvel em água, pode ser dissolvida num volume tão baixo quanto possível de um solvente orgânico adequado (por exemplo, hexano, acetona ou clorofórmio). Seguidamente, esta solução é misturada com 10 g de areia quartzítica fina por recipiente de ensaio. Deixa-se evaporar o solvente até à sua eliminação total da areia; adiciona-se, então, esta à quantidade adequada de sedimentos por cada copo de ensaio. Para solubilizar, dispersar ou emulsionar a substância em estudo apenas podem utilizar-se agentes de fácil volatilização. Ao preparar os sedimentos, importa ter em conta a areia associada à substância em estudo e a mistura de areia (ou seja, utiliza-se menos areia na preparação dos sedimentos). Deve ter-se o cuidado de assegurar que a substância em estudo adicionada aos sedimentos se encontra total e uniformemente distribuída nestes. Se necessário, podem analisar-se subamostras, a fim de determinar o grau de homogeneidade.

PLANEAMENTO DO ENSAIO

17. O planeamento do ensaio consiste na escolha do número e dos intervalos das concentrações de ensaio, do número de recipientes para cada concentração e do número de larvas por recipiente. Descreve-se de seguida o método de estimativa dos pontos CE e do NOEC, bem como de realização de ensaios do limite.

Análise por regressão

18. As concentrações testadas no ensaio deverão incluir as concentrações às quais se observam efeitos (por exemplo, CE_{15} e CE_{50}) e abranger a gama de concentrações para as quais o efeito da substância em estudo é significativo. De modo geral, é possível melhorar a exatidão e, em especial, a validade das estimativas das concentrações que produzem efeitos (CE_x) se essas concentrações se situarem na gama de concentrações ensaiadas. Devem evitar-se extrapolações muito abaixo da concentração positiva mais baixa ou acima da concentração mais elevada. É útil efetuar um ensaio exploratório preliminar para a escolha da gama de concentrações a utilizar no ensaio (ver o ponto 27).

▼M4

19. Caso se pretenda estimar uma CE_x, devem ser utilizados, pelo menos, cinco concentrações e três replicados de cada concentração. Em qualquer caso, para obter uma boa estimativa, é aconselhável ensaiar um número suficiente de concentrações. O fator entre as concentrações não deve ser superior a dois (se a curva de resposta à dose tiver um declive reduzido). Pode reduzir-se o número de replicados de cada concentração se for aumentado o número de concentrações de ensaio com respostas diferentes. O aumento do número de replicados ou a redução dos intervalos entre concentrações produz, em geral, intervalos de confiança mais estreitos. Caso se pretenda estimar a sobrevivência e o crescimento das larvas a 10 dias, é necessário utilizar mais replicados.

Estimativa de NOEC/LOEC

20. Caso se pretenda estimar o NOEC ou o LOEC, devem ensaiar-se cinco concentrações com, pelo menos, quatro replicados, não devendo o fator entre as concentrações ser superior a dois. O número de replicados deverá ser suficiente para garantir a possibilidade estatística de detetar de forma adequada uma diferença de 20 % relativamente ao controlo, com um grau de significância de 5 % (p = 0,05). No respeitante às taxas de desenvolvimento, é geralmente adequada uma análise de variância (ANOVA), como o teste de Dunnett ou o teste de Williams (17)(18)(19)(20). Quanto à taxa de emergência, podem utilizar-se os testes de Cochran-Armitage, o teste exato de Fisher (com a correção de Bonferroni) ou o teste de Mantel-Haentzal.

Ensaio do limite

21. Caso não sejam detetados efeitos no ensaio exploratório preliminar de seleção das concentrações, pode proceder-se a um ensaio do limite (uma concentração de ensaio e uma de controlo). O objetivo consiste em realizar um ensaio numa concentração suficientemente elevada para permitir aos decisores excluir a possibilidade de efeitos tóxicos da substância em estudo, sendo o limite fixado a uma concentração cuja ocorrência não se prevê em caso algum. Recomenda-se a utilização de 1 000 mg/kg (massa seca). Em geral, são necessários, pelo menos, seis replicados dos organismos expostos e de controlo. Deve comprovar-se existir a possibilidade estatística de detetar de forma adequada uma diferença de 20 % relativamente ao controlo, com um grau de significância de 5 % (p = 0,05). No que respeita ao efeito nas taxas de desenvolvimento e na massa, o teste *t* é um método estatístico adequado se os dados cumprirem os requisitos do teste (normalidade e variâncias homogéneas). Se estes requisitos não forem preenchidos, pode utilizar-se um teste *t* de variância desigual ou um teste não paramétrico, como o de Wilcoxon-Mann-Whithey. No que respeita à taxa de emergência, o teste exato de Fisher é adequado.

PROCEDIMENTO

Condições de exposição

Preparação do sistema sedimentos enriquecidos-água

22. Na aplicação da substância em estudo, recomenda-se o procedimento de enriquecimento descrito no método de ensaio C.8: "Toxicidade em relação às minhocas" (14). Coloca-se nos recipientes os sedimentos enriquecidos, adicionando-se água sobrenadante de forma a obter uma razão volúmica sedimentos-água de 1:4 (ver os pontos 11 e 15). A espessura da camada de sedimentos deve situar-se na gama 1,5-3 cm. Para evitar a separação de componentes dos sedimentos e a ressuspensão de materiais finos durante a criação da coluna de água, os sedimentos podem ser cobertos, enquanto a água é vertida, com um disco de plástico que se remove imediatamente depois. Podem também utilizar-se outros dispositivos.

23. Os recipientes de ensaio devem ser cobertos (por exemplo, com placas de vidro). Se necessário, o nível inicial de água pode ser reposto durante o ensaio, para compensar a evaporação. Para tal, deve utilizar-se água destilada ou desionizada, de modo a evitar a acumulação de sais.

▼M4

Estabilização

24. Quando estiverem preparados os sedimentos enriquecidos e a fase aquosa sobrenadante, é conveniente permitir a partição da substância em estudo entre a fase aquosa e os sedimentos (3)(4)(6)(13). A partição deve ocorrer, de preferência, às condições de temperatura e arejamento utilizadas no ensaio. O tempo necessário para atingir o equilíbrio depende dos sedimentos e do produto químico, podendo variar de algumas horas a vários dias e mesmo, em casos raros, a 4 ou 5 semanas. Dado que, nesse período, muitos produtos químicos são passíveis de sofrer degradação, não se espera até o equilíbrio total ser alcançado, recomendando-se a adoção de um período de equilíbrio de 48 horas. No final deste período, deve medir-se a concentração da substância em estudo na água sobrenadante, na água dos poros e nos sedimentos, pelo menos no caso da concentração máxima e de uma concentração menor (ver o ponto 38). Estas determinações analíticas da substância em estudo permitem o cálculo do balanço de massas e a expressão dos resultados com base nas concentrações medidas.

Introdução dos organismos em estudo

25. Quatro a cinco dias antes da introdução dos organismos em estudo nos recipientes de ensaio, devem colher-se aglomerados de ovos das culturas e colocá-los em pequenos recipientes com o meio de cultura. Pode utilizar-se meio proveniente da cultura-mãe ou um meio recentemente preparado. Neste último caso, importa adicionar ao meio de cultura uma pequena quantidade de alimentos, como, por exemplo, algas verdes e/ou algumas gotas de filtrado de uma suspensão de alimento para peixes finamente moído (ver o apêndice 2). Apenas devem ser utilizados aglomerados de ovos de postura recente. Normalmente, as larvas começam a eclodir alguns dias após a postura dos ovos (2 a 3 dias, a 20 °C, no caso das *Chironomus riparius*, e 1 a 4 dias no caso das *Chironomus tentans*, a 23 °C, e das *Chironomus yoshimatsui*, a 25 °C); o crescimento das larvas ocorre em quatro estádios larvares, cada um com a duração de 4 a 8 dias. Utilizar no ensaio larvas do primeiro estádio larvar (2-3 ou 1-4 dias após a eclosão). O estádio larvar dos insetos pode, eventualmente, ser verificado por exame da largura da cápsula cefálica (6).

26. Com o auxílio de uma pipeta embotada, coloca-se aleatoriamente vinte larvas do primeiro estádio larvar em cada recipiente de ensaio contendo os sedimentos enriquecidos e a água. O arejamento da água tem de ser suspenso durante a colocação das larvas nos recipientes de ensaio, assim permanecendo nas 24 horas subsequentes a esta operação (ver os pontos 25 e 32). Consoante o tipo de ensaio realizado (ver os pontos 19 e 20), o número de larvas por concentração deve ser, no mínimo, de 60, no caso de estimativas de pontos CE, e de 80, no caso das determinações de NOEC.

Concentrações de ensaio

27. Pode ser útil efetuar um ensaio exploratório para a determinação da gama de concentrações a utilizar no ensaio definitivo. Para o efeito, recorre-se a uma série de concentrações espaçadas da substância em estudo. Garantindo que a densidade de quironomídeos por unidade de superfície seja idêntica à utilizada no ensaio definitivo, os quironomídeos são expostos a cada concentração da substância em estudo por um período que permita uma estimativa das concentrações de ensaio adequadas, não sendo necessários replicados.

28. As concentrações a utilizar no ensaio definitivo são decididas com base nos resultados do ensaio exploratório. Devem ser utilizadas pelo menos cinco concentrações, selecionadas do modo descrito nos pontos 18 a 20.

▼M4

Controlos

29. Deve utilizar-se no ensaio um número adequado de recipientes de controlo sem a substância em estudo, mas com os sedimentos (ver os pontos 19-20). Caso se recorra a um solvente para a incorporação da substância em estudo (ver o ponto 16), deve efetuar-se um controlo utilizando sedimentos com solvente.

Sistema de ensaio

30. São utilizados sistemas estáticos. Em casos excecionais, pode utilizar-se sistemas semiestáticos ou sistemas de escoamento com renovação intermitente ou contínua da água sobrenadante, por exemplo, se as características de qualidade da água se tornarem inadequadas ao organismo em estudo ou afetarem o equilíbrio químico (isto é, se os teores de oxigénio dissolvido baixarem demasiado, se a concentração de produtos de excreção aumentar demasiado, se ocorrer lixiviação de minerais dos sedimentos que afete o pH e/ou dureza da água, etc.). Deve preferir-se, contudo, o recurso a outros métodos para melhorar a qualidade da água sobrenadante, como o arejamento, que é, em geral, suficiente.

Alimentação

31. É necessário alimentar as larvas, de preferência diariamente ou, no mínimo, três vezes por semana. Utilizar alimento para peixes (suspensão em água ou finamente moído, por exemplo, Tetra-Min or Tetra-Phyllou; ver pormenores no apêndice 2); a quantidade de 0,25-0,5 mg (0,35-0,5 mg no caso de *C. yoshimatsui*) por larva e dia afigura-se adequada para as larvas jovens, nos primeiros 10 dias. Após este período, pode ser necessária uma quantidade ligeiramente superior: 0,5-1 mg por larva e dia deve bastar para o resto do ensaio. A ração alimentar deve ser reduzida a todos os organismos expostos e aos controlos caso se observe crescimento fúngico ou se verifique mortalidade nos controlos. Se não for possível impedir o crescimento fúngico, deve repetir-se o ensaio. Quando se estuda substâncias fortemente adsorventes (por exemplo, com log K_{ow} > 5) ou substâncias ligadas aos sedimentos por ligações covalentes, a quantidade de alimentos necessária para assegurar a sobrevivência e o crescimento natural dos organismos pode ser adicionada aos sedimentos formulados, antes do período de estabilização. Para esse fim, devem ser utilizados matérias vegetais em vez de alimentos para peixes; a título de exemplo, 0,5 % (massa seca) de folhas finamente moídas de espécies como a urtiga comum (*Urtica dioeca*), a amoreira (*Morus alba*), o trevo branco (*Trifolium repens*), o espinafre (*Spinacia oleracea*) ou outras matérias de origem vegetal (*Cerophyl* ou α-celulose).

Condições de incubação

32. O arejamento ligeiro da água sobrenadante nos recipientes de ensaio deve iniciar-se, de preferência, 24 horas após a introdução das larvas, prosseguindo ao longo de todo o ensaio (deve evitar-se que a concentração de oxigénio dissolvido baixe para valores inferiores a 60 % do VSA). O arejamento é efetuado por intermédio de uma pipeta de Pasteur de vidro, fixada 2-3 cm acima da camada de sedimentos (caudal: uma ou poucas bolhas por segundo). No ensaio de produtos químicos voláteis, pode optar-se por não arejar o sistema sedimentos-água.

33. O ensaio é realizado a temperatura constante (20 °C ± 2 °C). No caso das espécies *C. tentans* e *C. yoshimatsui*, as temperaturas recomendadas são 23 °C e 25 °C (± 2 °C), respetivamente. Utiliza-se um período de irradiação de 16 horas, com uma intensidade luminosa de 500 a 1 000 lux.

▼M4

Duração da exposição

34. A exposição começa com a introdução das larvas nos recipientes enriquecidos e nos recipientes de controlo. A duração máxima da exposição é de 28 dias para a *C. riparius* e a *C. yoshimatsui* e de 65 dias para a *C. tentans*. Se os insetos emergirem precocemente, pode pôr-se termo ao ensaio, no mínimo, cinco dias após a emergência do último indivíduo adulto nos recipientes de controlo.

Observações

Emergência

35. Determina-se o tempo de desenvolvimento e o número total de insetos machos e fêmeas totalmente emergidos. Os machos são facilmente identificados pelas suas antenas plumosas.

36. Os recipientes de ensaio devem ser observados pelo menos três vezes por semana, a fim de apreciar visualmente qualquer comportamento anormal (por exemplo, saída dos sedimentos, natação anormal) em relação aos recipientes de controlo. Durante o período de emergência previsto, é necessário proceder à contagem diária dos insetos emergidos. O sexo e o número de insetos totalmente emergidos são registados diariamente. Após a identificação, remove-se os insetos dos recipientes. Quaisquer aglomerados de ovos postos antes do termo do ensaio devem ser registados e, de seguida, removidos, para evitar a reintrodução de larvas nos sedimentos. Regista-se também o número de ninfas visíveis que não emergiram. O apêndice 5 contém orientações sobre a mensuração da emergência.

Crescimento e sobrevivência

37. Se for necessário obter dados sobre a sobrevivência e o crescimento das larvas em dez dias, devem prever-se recipientes de ensaio suplementares desde o início, para que possam ser utilizados posteriormente. Os sedimentos destes recipientes são passados por um crivo com abertura de malha de 250 μm, para reter as larvas. Os critérios de morte são a imobilidade e a ausência de reação a estímulos mecânicos. As larvas não recuperadas devem também ser contadas como mortas (as larvas que morreram no início do ensaio podem ter sido degradadas por micróbios). Determina-se a massa seca, isenta de cinzas, de larvas sobreviventes em cada recipiente de ensaio, calculando-se a massa seca média por recipiente. É útil determinar o estádio larvar das larvas sobreviventes; para tal, pode recorrer-se à medição da largura da cápsula cefálica de cada indivíduo.

Determinações analíticas

Concentração da substância em estudo

38. Antes do início do ensaio (isto é, da introdução das larvas), procede-se à colheita de amostras da massa de sedimentos de, pelo menos, um recipiente por exposição, para a determinação analítica da concentração da substância em estudo. Recomenda-se que sejam analisadas, no início (ver o ponto 24) e no final do ensaio, no mínimo, amostras da água sobrenadante, da água dos poros e dos sedimentos correspondentes à concentração mais elevada e a uma concentração inferior. Estas determinações da concentração da substância em estudo proporcionam informações sobre o comportamento e/ou a partição da mesma no sistema água-sedimentos.

39. Quando se efetuam medições intermédias (por exemplo, no 7.º dia) e a análise necessita de amostras grandes que não podem ser colhidas dos recipientes de ensaio sem influenciar o sistema em estudo, as determinações analíticas devem ser realizadas com amostras colhidas de recipientes de ensaio suplementares tratados da mesma forma (incluindo a presença dos organismos em estudo), mas que não são alvo de observações biológicas.

▼M4

40. A centrifugação a cerca de 10 000 g e 4 °C, durante 30 minutos, é o procedimento recomendado para isolar a água intersticial. No entanto, caso se demonstre que a substância em estudo não é adsorvida aos filtros, a filtragem também é aceitável. Em alguns casos, se a amostra for demasiado pequena, poderá não ser possível analisar concentrações na água dos poros.

Parâmetros físico-químicos

41. O pH e a temperatura dos recipientes de ensaio devem ser medidos de forma adequada (ver o ponto 10). A dureza e o ião amónio devem ser medidos nos recipientes de controlo e num recipiente de ensaio com a concentração mais elevada, no início e no final do ensaio.

DADOS E RELATÓRIOS

Tratamento dos resultados

42. O objetivo deste ensaio consiste em determinar o efeito da substância em estudo nas taxas de desenvolvimento e no número total de insetos machos e fêmeas totalmente emergidos ou, no caso dos ensaios de 10 dias, os efeitos na sobrevivência e no peso das larvas. Se não houver indicação de sensibilidades estatisticamente diferentes entre os sexos, os resultados relativos aos machos e às fêmeas podem ser agrupados para efeitos de análise estatística. As diferenças de sensibilidade entre os sexos podem ser avaliadas estatisticamente, por exemplo, recorrendo a um ensaio de tabela de contingência χ^2-r x 2. Se necessário, determina-se a sobrevivência das larvas e a massa seca por recipiente após 10 dias.

43. As concentrações com efeitos, expressas em relação à massa seca, são calculadas de preferência a partir das concentrações medidas nos sedimentos no início do ensaio (ver o ponto 38).

44. Para efetuar uma estimativa pontual do valor CE_{50} ou de qualquer valor CE_x, podem equiparar-se os dados estatísticos por recipiente aos de ensaios idênticos reais. No cálculo de um intervalo de confiança para qualquer valor CE_x, importa ter em conta a variabilidade entre recipientes, ou deve demonstrar-se que essa variabilidade é tão reduzida que pode ser ignorada. Se o modelo for ajustado pelo método dos mínimos quadrados, deve aplicar-se uma transformação aos dados estatísticos por recipiente, para melhorar a homogeneidade da variância. Contudo, os valores de CE_x só devem ser calculados após retransformação da resposta no valor inicial.

45. Se a análise estatística tiver por objetivo determinar o NOEC/LOEC utilizando hipóteses estatísticas, importa ter em conta a variabilidade entre recipientes, por exemplo, aplicando um método ANOVA hierarquizado. Se não se verificarem os pressupostos comuns do método ANOVA, testes mais robustos podem constituir uma alternativa adequada (21).

Taxa de emergência

46. As taxas de emergência são dados de "tudo ou nada", que podem ser analisados através de um teste de Cochran-Armitage aplicado de forma regressiva, nos casos em que se prevê uma relação monótona entre a dose fornecida e a resposta e os dados são compatíveis com a previsão. Caso contrário, pode recorrer-se a um teste exato de Fisher ou a um teste de Mantel-Haentzal com valores *p* ajustados segundo o método de Bonferroni-Holm. Se, para a mesma concentração, houver indícios de uma maior variabilidade entre replicados do que a sugerida por uma distribuição binomial (frequentemente referida como variação "extrabinomial"), deve utilizar-se um teste exato de Fisher ou um teste de Cochran-Armitage robusto, como proposto na referência 21.

▼M4

Determina-se a soma dos insetos emergidos por recipiente, ne, que é seguidamente dividida pelo número de larvas nele introduzidas, n_a:

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

em que:

ER = Taxa de emergência

n_e = Número de insetos emergidos no recipiente

n_a = Número de larvas introduzidas no recipiente

47. Uma alternativa mais adequada a amostras grandes, quando se regista variância extrabinomial, consiste em considerar a taxa de emergência uma resposta contínua e aplicar procedimentos como o teste de William, caso se preveja uma relação monótona entre a dose fornecida e a resposta, compatível com os dados de taxa de emergência em causa. Por seu turno, o teste de Dunnett é adequado aos casos em que não se regista uma relação monótona. Neste contexto, uma amostra "grande" é definida como aquela em que o número total de insetos emergidos e não emergidos é, em ambos os casos, superior a cinco por replicado (recipiente).

48. A aplicação de métodos ANOVA implica que os valores de taxa de emergência sejam sujeitos a uma transformação de arco-seno da raiz quadrada ou a uma transformação de Tukey-Freeman, de forma a obter uma distribuição aproximadamente normal e uniformizar as variâncias. Os testes de Cochran-Armitage, exato de Fisher (Bonferroni) e Mantel-Haentzal podem ser aplicados quando se utilizam frequências absolutas. A transformação de arco-seno da raiz quadrada consiste em calcular o inverso do seno ($\sin^{-1}$) da raiz quadrada do valor da taxa de emergência.

49. No respeitante às taxas de emergência, os valores de CE_x são calculados por análise de regressão – por exemplo, por recurso aos modelos *probit* (22), *logit* ou Weibull ou a programas informáticos comerciais adequados. Em caso de fracasso da análise de regressão (por exemplo, se o número de respostas parciais for inferior a dois), utilizam-se outros métodos não paramétricos, como a média móvel ou a simples interpolação.

Taxa de desenvolvimento

50. O tempo médio de desenvolvimento representa o tempo médio decorrido entre a introdução das larvas (dia 0 do ensaio) e a emergência da coorte experimental de insetos (para o cálculo do tempo de desenvolvimento real, é necessário ter em conta a idade das larvas no momento da introdução). A taxa de desenvolvimento é o inverso do tempo de desenvolvimento (unidade: 1/dia) e representa a quantidade de desenvolvimento larvar que ocorre por dia. A taxa de desenvolvimento é o parâmetro preferido para a avaliação destes estudos de toxicidade dos sedimentos, dado que a sua variância é mais baixa que a do tempo de desenvolvimento, sendo também mais homogénea e mais próxima da distribuição normal. Os testes paramétricos mais potentes estão mais adaptados à taxa de desenvolvimento do que ao tempo de desenvolvimento. Considerando a taxa de desenvolvimento uma resposta contínua, os valores de CE_x podem ser estimados por recurso a uma análise de regressão – por exemplo, como descrito em (23)(24).

51. No contexto dos testes estatísticos que se seguem, considera-se que o número de insetos observado no dia de inspeção x emergiu no ponto médio do intervalo de tempo compreendido entre o dia x e o dia x-d (d = duração do intervalo de inspeção, em geral 1 dia). A taxa de desenvolvimento média por recipiente (é calculada com base nas seguintes equações:

$$\overline{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i x_i}{n_e}$$

▼M4

em que:

$\bar{x}$: Taxa de desenvolvimento média por recipiente

i: Índice do intervalo de inspeção

m: Número máximo de intervalos de inspeção

f_i: Número de insetos emergidos no intervalo de inspeção *i*

n_e: Número total de insetos emergidos no final do ensaio ($=\sum f_i$)

x_i: Taxa de desenvolvimento dos insetos emergidos no intervalo *i*

$$x_i = \frac{1}{\left(dia_i - \frac{1_i}{2}\right)}$$

em que:

dia_i: Dia da inspeção (n.º de dias decorridos desde a introdução dos organismos)

d_i: Duração do intervalo de inspeção *i* (dias, em geral 1 dia)

Relatório dos ensaios

52. O relatório dos ensaios deve incluir, no mínimo, as seguintes informações:

Substância em estudo:

— natureza física e, quando pertinente, propriedades físico-químicas (solubilidade na água, pressão de vapor, coeficiente de partição no solo — ou nos sedimentos, se disponível —, estabilidade em água, etc.),

— dados de identificação química (denominação comum, denominação química, fórmula estrutural, número CAS, etc.), incluindo o grau de pureza e o método analítico de quantificação da substância.

Espécies utilizadas nos ensaios:

— animais: espécie, nome científico, origem dos organismos e condições de reprodução,

— informações sobre o manuseamento dos aglomerados de ovos e das larvas,

— idade dos animais quando introduzidos nos recipientes de ensaio.

Condições experimentais:

— sedimentos utilizados, isto é, de origem natural ou formulados,

— no caso dos sedimentos naturais, localização e descrição do local de colheita, incluindo, se possível, o historial de contaminação; características: pH, teor de carbono orgânico, razão C/N e granulometria (se pertinente),

— preparação dos sedimentos formulados: ingredientes e características (teor de carbono orgânico, pH, humidade, etc., no início dos ensaios),

— preparação da água para os ensaios, caso seja utilizada água reconstituída, e respetivas características (concentração de oxigénio, pH, condutividade, dureza, etc., no início dos ensaios),

— espessura dos sedimentos e da água sobrenadante,

— volume de água sobrenadante e de água dos poros; massa do sedimento húmido com e sem a água dos poros,

▼**M4**

— recipientes de ensaio (material e dimensões),

— método de enriquecimento dos sedimentos: concentrações de ensaio utilizadas, número de replicados e solvente utilizado, se for o caso,

— fase de estabilização do sistema sedimentos enriquecidos-água: duração e condições,

— condições de incubação: temperatura, ciclo de luz e intensidade luminosa, arejamento (frequência e intensidade),

— informações pormenorizadas sobre a alimentação dos organismos, incluindo o tipo de alimentos, a preparação, a quantidade e o regime alimentar.

Resultados:

— concentrações de ensaio nominais, concentrações de ensaio medidas e resultados de todas as análises efetuadas para determinar a concentração da substância em estudo nos recipientes de ensaio,

— qualidade da água nos recipientes de ensaio (pH, temperatura, oxigénio dissolvido, dureza e teor de ião amónio),

— renovação da água evaporada nos ensaios, se for o caso,

— número de insetos machos e fêmeas emergidos por recipiente e dia,

— número de larvas que não originaram insetos, por recipiente,

— massa seca média de larvas por recipiente e, se for caso disso, por estádio larvar,

— percentagem de emergência por replicado e por concentração de ensaio (machos e fêmeas no seu conjunto),

— taxa média de desenvolvimento de insetos totalmente emergidos por replicado e por concentração de ensaio (machos e fêmeas no seu conjunto),

— estimativas de parâmetros de toxicidade, como, por exemplo, CEx (e os intervalos de confiança associados), NOEC e/ou LOEC e métodos estatísticos utilizados para a determinação dos mesmos,

— discussão dos resultados, incluindo qualquer influência nos resultados do ensaio decorrente de alterações efetuadas ao presente método de ensaio.

REFERÊNCIAS:

(1) BBA (1995). Long-term *toxicity* test with Chironomus riparius: Development and validation of a new test system. Editado por M. Streloke e H. Köpp. Berlim, 1995.

(2) Fleming R. *et al.* (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Final Report to the European Commission. Report No: EC 3738. Agosto de 1994. WRc, Reino Unido.

(3) SETAC (1993). Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. WOSTA Workshop realizado nos Países Baixos.

(4) ASTM International/E1706-00 (2002). Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. p. 1125-1241. *In* ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International. West Conshohocken, PA.

(5) Environment Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. Dezembro de 1997.

▼M4

(6) US-EPA (2000). Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Segunda edição. EPA 600/R-99/064. Março de 2000. Revisão da primeira edição de junho de 1994.

(7) US-EPA/OPPTS 850.1735. (1996): Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.

(8) US-EPA/OPPTS 850.1790. (1996): Chironomid Sediment toxicity Test.

(9) Milani D., Day K.E., McLeay D.J., Kirby R.S. (1996). Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods *(Hyalella azteca)* and midge larvae *(Chironomus riparius)*. Technical Report. Environment Canada. National Water Research Institute. Burlington, Ontário, Canadá.

(10) Sugaya Y. (1997). Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides *in Chironomus yoshimatsui*. *Jp. J. Sanit. Zool.* 48 (4): 345-350.

(11) Kawai K. (1986). Fundamental studies on Chironomid allergy. I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera). *Jp. J. Sanit. Zool.* 37(1): 47-57.

(12) OCDE (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

(13) Environment Canada (1995). Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant. Report EPS 1/RM/30. Setembro de 1995.

(14) Capítulo C.8 deste anexo: Toxicidade em relação às minhocas.

(15) Suedel B.C., Rodgers J.H. (1994). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. *Environ. Toxicol. Chem.* 13: 1163-1175.

(16) Naylor C., Rodrigues C. (1995). Development of a test method for Chironomus riparius using a formulated sediment. *Chemosphere* 31: 3291-3303.

(17) Dunnett C.W. (1964). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statis. Assoc.* 50: 1096-1121.

(18) Dunnett C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics* 20: 482-491.

(19) Williams D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics* 27: 103-117.

(20) Williams D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics* 28: 510-531.

(21) Rao J.N.K., Scott A.J. (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. *Biometrics* 48: 577-585.

(22) Christensen E.R. (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. *Water Research* 18: 213-221.

(23) Bruce, Versteeg (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environmental Toxicology and Chemistry* 11: 1485-1494.

(24) Slob W. (2002). Dose-response modelling of continuous endpoints. *Toxicol. Sci.* 66: 298-312.

▼**M4**

Apêndice 1

DEFINIÇÕES

No âmbito do presente método de ensaio, aplicam-se as seguintes definições:

Sedimentos formulados ou reconstituídos, artificiais ou sintéticos: mistura de matérias utilizadas para simular os componentes físicos de sedimentos naturais.

Água sobrenadante: água situada acima da superfície dos sedimentos, no recipiente de ensaio.

Água intersticial ou água dos poros: água que ocupa o espaço entre as partículas de sedimentos e de solo.

Sedimentos enriquecidos: sedimentos aos quais foi adicionada a substância em estudo.

Produto químico em estudo: qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado o presente método de ensaio.

▼M4

Apêndice 2

Recomendações para a cultura de *chironomus riparius*

1. As larvas de *Chironomus* podem ser criadas em caixas de cristalização ou recipientes de maiores dimensões. Espalha-se no fundo do recipiente areia quartzítica fina de modo a constituir uma camada fina com 5 a 10 mm de espessura. Verificou-se que o *kieselguhr* (p. ex. Merck 8117) é também um substrato adequado; neste caso, pode utilizar-se uma camada mais fina, da ordem de poucos milímetros. Adiciona-se de seguida uma coluna de vários centímetros de uma água adequada. Se necessário, os níveis de água podem ser repostos para compensar a evaporação e evitar a dessecação. A água pode ser substituída, se necessário. Deve efetuar-se um arejamento ligeiro. Os recipientes de criação das larvas devem ser mantidos em gaiolas adequadas, de forma a evitar fugas de adultos emergentes. A gaiola deve ser suficientemente grande (no mínimo, cerca de 30 x 30 x 30 cm), para permitir a enxameação dos adultos emergidos, sem o que poderá não ocorrer copulação.

2. As gaiolas devem ser mantidas à temperatura ambiente ou a uma temperatura constante de 20 ± 2 °C, com um período de luminosidade (cerca de 1 000 lux) de 16 horas e oito horas de escuridão. Existem referências documentais de que um teor de humidade relativa do ar inferior a 60 % pode impedir a reprodução.

Água de diluição

3. Pode utilizar-se qualquer água natural ou reconstituída adequada. Utiliza-se em geral água de poços, água da rede de abastecimento desclorada e meios artificiais (por exemplo, meio Elendt M4 ou M7; ver abaixo). A água tem de ser arejada antes da utilização. Se necessário, a água das culturas pode ser renovada por vazamento ou sifonagem cuidadoso da água dos recipientes de cultura, para não destruir os tubos das larvas.

Alimentação das larvas

4. As larvas de *Chironomus* são alimentadas com cerca de 250 mg por recipiente e por dia de um alimento floculado para peixes (Tetra Min®, Tetra Phyll® ou outra marca semelhante). Os alimentos podem ser administrados na forma de um pó seco finamente moído ou de uma suspensão em água: adicionar 1,0 g de alimento floculado a 20 ml de água de diluição e misturar de modo a obter uma mistura homogénea. Esta preparação pode ser administrada ao caudal aproximado de 5 ml por recipiente e por dia (agitar antes da utilização). Pode administrar-se às larvas de idade superior uma maior quantidade de alimento.

5. A alimentação é ajustada em função da qualidade da água. Se o meio de cultura se tornar turvo, deve reduzir-se a alimentação. A administração de alimentos deve ser objeto de um registo minucioso. A escassez de alimentos causaria migração das larvas para a coluna de água, enquanto uma alimentação demasiado rica aumentaria a atividade microbiana e reduziria a concentração de oxigénio. Ambas estas condições podem resultar numa redução das taxas de crescimento.

6. Ao preparar novos recipientes de cultura, podem também adicionar-se algumas células de algas verdes (por exemplo, *Scenedesmus subspicatus* e *Chlorella vulgaris*).

Alimentação dos adultos emergidos

7. Alguns experimentadores sugeriram que um tampão de algodão embebido numa solução saturada de sacarose pode servir de alimento para os adultos emergidos.

▼M4

Emergência

8. À temperatura de 20 ± 2 °C, os adultos começam a emergir dos recipientes de criação das larvas decorridos 13 a 15 dias. Os machos são facilmente distinguidos pelas suas antenas plumosas.

Aglomerados de ovos

9. Quando se encontrarem presentes adultos nas gaiolas de criação, deve verificar-se três vezes por semana se ocorre a deposição de aglomerados gelatinosos de ovos nos recipientes de criação das larvas. Se tal suceder, devem ser removidos com cuidado e transferidos para uma pequena cápsula com uma amostra da água de incubação. Os aglomerados de ovos são utilizados para iniciar novas culturas noutros recipientes (p. ex., 2-4 aglomerados de ovos por recipiente) ou em ensaios de toxicidade.

10. As larvas do primeiro estádio larvar devem eclodir decorridos 2-3 dias.

Preparação de novos recipientes de cultura

11. Quando as culturas estiverem estabelecidas, deverá ser possível preparar um novo recipiente de cultura de larvas por semana, ou com uma frequência menor (consoante os requisitos dos ensaios), removendo os recipientes mais antigos após a emergência dos insetos adultos. O recurso a este sistema permite obter um aprovisionamento regular de insetos adultos com uma gestão mínima.

Preparação das soluções de ensaio M4 e M7

12. O meio M4 foi descrito por Elendt (1990). O meio M7 é preparado do mesmo modo que o M4, exceto no que respeita às substâncias indicadas no quadro 1, cujas concentrações são quatro vezes inferiores às do meio M4. Encontra-se em preparação um artigo sobre o meio M7 (Elendt, comunicação pessoal). A solução de ensaio não deve ser preparada em conformidade com as indicações de Elendt e Bias (1990), dado as concentrações de NaSiO3.5H2O, NaNO3, KH2PO4 e K2HPO4 apresentadas para a preparação das soluções-mãe não serem adequadas.

Preparação do meio M7

13. Cada solução-mãe (I) é preparada individualmente, sendo preparada uma solução-mãe combinada (II) a partir dessas soluções (I) (ver o quadro 1). O meio M7 é preparado diluindo para 1 l, com água desionizada, 50 ml da solução-mãe combinada (II) e as quantidades de cada solução-mãe de macronutrientes indicadas no quadro 2. Prepara-se uma solução-mãe de vitaminas juntando três vitaminas a água desionizada, como indicado no quadro 3; adiciona-se 0,1 ml da solução-mãe combinada de vitaminas ao meio M7 final pouco antes da utilização (a solução-mãe de vitaminas é armazenada por congelação, em pequenas alíquotas). O meio é arejado e estabilizado.

REFERÊNCIAS

BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Editado por M. Streloke e H.Köpp. Berlim, 1995.

▼**M4**

Quadro 1

Soluções-mãe de elementos vestigiais para os meios M4 e M7

Soluções-mãe (I)	Quantidade (mg) diluída para 1 litro com água desionizada	Para preparar a solução-mãe combinada (II), misturar as seguintes quantidades (ml) de soluções-mãe (I) e diluir para 1 litro com água desionizada		Concentrações finais nas soluções de ensaio (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3 (1)	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$ (1)	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl (1)	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077
RbCl (1)	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$ (1)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (1)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$ (1)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$ (1)	335	1,0	0,25	0,017	0,004
$ZnCl_2$	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$CaCl_2 \cdot 6\ H_2O$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na_2SeO_3	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
$Na_2EDTA \cdot 2\ H_2O$ (1) (2)	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$ (1) (2)	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Estas substâncias são diferentes nos meios M4 e M7, como se indica no quadro.
(2) Estas soluções são preparadas individualmente, misturadas e colocadas de imediato numa autoclave.

Quadro 2

Soluções-mãe de macronutrientes para os meios M4 e M7

	Quantidade (mg) diluída para 1 litro com água desionizada	Quantidade de soluções-mãe de macronutrientes adicionada para preparar os meios M4 e M7 (ml/l)	Concentrações finais nas soluções de ensaio M4 e M7 (mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	293 800	1,0	293,8
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
$NaHCO_3$	64 800	1,0	64,8
$NaSiO_3 \cdot 9\ H_2O$	50 000	0,2	10,0
$NaNO_3$	2 740	0,1	0,274
KH_2PO_4	1 430	0,1	0,143
K_2HPO_4	1 840	0,1	0,184

▼**M4**

Quadro 3

Soluções-mãe de vitaminas para os meios M4 e M7. As três soluções de vitaminas são combinadas para originar uma única solução-mãe.

	Quantidade (mg) diluída para 1 litro com água desionizada	Quantidade de solução-mãe de vitaminas adicionada para preparar os meios M4 e M7 (ml/l)	Concentrações finais nas soluções de ensaio M4 e M7 (mg/l)
Cloridrato de tiamina	750	0,1	0,075
Cianocobalamina (B12)	10	0,1	0,0010
Biotina	7,5	0,1	0,00075

REFERÊNCIAS

Elendt B.P. (1990). Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoplasma* 154: 25-33.

Elendt B.P., Bias W.-R. (1990). Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *D. magna*. *Water Research* 24 (9): 1157-1167.

▼M4

Apêndice 3

PREPARAÇÃO DOS SEDIMENTOS FORMULADOS

Composição dos sedimentos

A composição dos sedimentos formulados deve ser a seguinte:

Componente	Características	% da massa seca dos sedimentos
Turfa	Turfa de *Sphagnum*, com pH tão próximo quanto possível do intervalo 5,5--6,0, sem restos visíveis de plantas, finamente moída (granulometria ≤ 1 mm) e seca ao ar	4-5
Areia quartzítica	Granulometria: > 50 % das partículas de granulometria na gama 50-200 μm	75-76
Argila caulinítica	Teor de caulinite ≥ 30 %	20
Carbono orgânico	Ajustado por adição de turfa e areia	2 (±0,5)
Carbonato de cácio	$CaCO_3$ pulverizado quimicamente puro	0,05-0,1
Água	Condutividade ≤ 10 μS/cm	30-50

Preparação

A turfa é seca ao ar e moída até se obter um pó fino. Prepara-se uma suspensão da quantidade necessária de turfa pulverizada em água desionizada, por recurso a um dispositivo de homogeneização de alta eficiência. O pH desta suspensão é ajustado para 5,5 ± 0,5 com $CaCO_3$. A suspensão é acondicionada durante, pelo menos, dois dias, com agitação ligeira a 20 ± 2 °C, para estabilizar o pH e estabelecer um perfil microbiano estável. Findo este período, determina-se novamente o pH, que deve ser de 6,0 ± 0,5. A suspensão de turfa é então misturada com os outros componentes (areia e argila caulinítica) e água desionizada, de forma a obter sedimentos homogéneos com um teor de água da ordem de 30 %--50 % da massa seca dos sedimentos. O pH da mistura final é determinado uma vez mais e, se necessário, ajustado para 6,5-7,5 com $CaCO_3$. São colhidas amostras dos sedimentos para determinar o resíduo seco e o teor de carbono orgânico. Recomenda-se que, antes de ser utilizados num ensaio de toxicidade em quironomídeos, os sedimentos formulados sejam acondicionados durante sete dias em condições idênticas às do ensaio subsequente.

Armazenagem

Os componentes secos para a preparação dos sedimentos artificiais podem ser armazenados num local seco e fresco, à temperatura ambiente. Os sedimentos formulados (húmidos) não devem ser armazenados antes da sua utilização nos ensaios. Devem ser utilizados imediatamente após o período de acondicionamento de sete dias que conclui a sua preparação.

REFERÊNCIAS

Capítulo C.8 deste anexo: Toxicidade em relação às minhocas.

Meller M., Egeler P., Rombke J., Schallnass H., Nagel R., Streit B. (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media. *Ecotox. and Environ. Safety* 39: 10-20.

▼**M4**

Apêndice 4

Características químicas de uma água de diluição adequada

Substância	Concentrações
Partículas	< 20 mg/l
Carbono orgânico total	< 2 mg/l
Amoníaco não ionizado	< 1 µg/l
Dureza expressa em $CaCO_3$	< 400 mg/l (*)
Cloro residual	< 10 µg/l
Pesticidas organofosforados totais	< 50 ng/l
Soma dos pesticidas organoclorados e dos bifenilos policlorados, totais	< 50 ng/l
Cloro orgânico total	< 25 ng/l

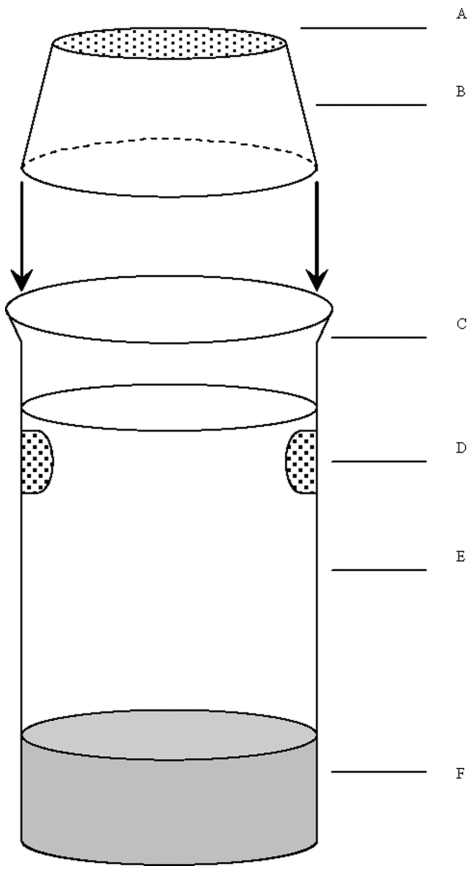
(*) Contudo, caso se suspeite da existência de uma interação entre os iões responsáveis pela dureza e a substância em estudo, deve utilizar-se uma água mais macia (nesse caso, o meio Elendt M4 não pode ser utilizado).

▼M4

Apêndice 5

Orientações para a monitorização da emergência das larvas de quironomídeos

Os copos de ensaio são munidos de armadilhas de emergência. Estas armadilhas são necessárias a partir do vigésimo dia, até ao final do ensaio. A título de exemplo, pode utilizar-se o dispositivo abaixo ilustrado:



A: tela de nylon

B: copo de plástico invertido

C: copo de exposição sem bico

D: aberturas recobertas, para renovação da água

E: água

F: sedimentos

▼M4

C.28. ENSAIO DE TOXICIDADE EM QUIRONOMÍDEOS NUM SISTEMA SEDIMENTOS-ÁGUA COM ÁGUA ENRIQUECIDA

INTRODUÇÃO

1. O presente método de ensaio é equivalente ao *Test Guideline* TG 219 da OCDE (2004). Foi concebido para avaliar os efeitos nas larvas dos dípteros de água doce *Chironomus* sp., que vivem nos sedimentos, de uma exposição prolongada a determinados produtos químicos. Baseia-se principalmente nas orientações da BBA, utilizando um sistema de ensaio sedimentos-água num cenário de exposição com solo artificial e coluna de água (1). Tem também em conta os atuais protocolos de ensaios de toxicidade para as espécies *Chironomus riparius* e *Chironomus tentans* que foram desenvolvidos na Europa (1)(2)(3) e na América do Norte (2)(3)(4)(5)(6)(7)(8) e foram sujeitos a um ensaio interlaboratorial (1)(6)(9). Podem também utilizar-se outras espécies de quironomídeos bem documentadas, como a *Chironomus yoshimatsui* (10)(11).

2. O cenário de exposição utilizado neste método de ensaio passa pelo enriquecimento da água na substância em estudo. A seleção do cenário de exposição adequado depende da finalidade do ensaio. O cenário de exposição na água, que envolve o enriquecimento da coluna de água na substância em estudo, tem por objetivo simular as perdas por dispersão na aplicação de pesticidas e abrange o pico de concentrações inicial na água dos poros. É também útil para outros tipos de exposições (incluindo o derrame de produtos químicos), com exceção dos processos de acumulação mais demorados do que o período do ensaio.

3. As substâncias a ensaiar com organismos que vivem nos sedimentos persistem, em geral, neste compartimento durante longos períodos. A exposição dos referidos organismos pode ter lugar por várias vias. A importância relativa de cada via de exposição, bem como o tempo de contribuição de cada uma delas para os efeitos tóxicos globais, depende das propriedades físico-químicas do produto químico em causa. No caso de substâncias fortemente adsorventes (por exemplo, com log K_{ow} > 5) ou de substâncias ligadas aos sedimentos por ligações covalentes, a ingestão de alimentos contaminados pode constituir uma via de exposição significativa. Para não subestimar a toxicidade das substâncias altamente lipófilas, pode ponderar-se a utilização de alimentos adicionados aos sedimentos antes da aplicação da substância em estudo. De forma a ter em conta todas as vias de exposição potenciais, o presente método de ensaio focaliza-se na exposição a longo prazo. A duração do ensaio é de 20 a 28 dias para *C. riparius* e *C. yoshimatsui* e de 28 a 65 dias para *C. tentans*. Se forem necessários dados a curto prazo para uma finalidade específica (por exemplo, para investigar os efeitos de um produto químico instável), é possível utilizar replicados adicionais a remover após de dez dias.

4. Os parâmetros medidos são o número total de indivíduos adultos emergidos e o tempo necessário para tal. Se forem necessários dados adicionais a curto prazo, recomenda-se que as determinações da sobrevivência e do crescimento das larvas apenas sejam efetuadas após um período de dez dias, recorrendo aos replicados adicionais que se justifiquem.

5. Recomenda-se a utilização de sedimentos formulados. Estes apresentam várias vantagens relativamente aos sedimentos naturais:

   — a variabilidade experimental é reduzida porque os sedimentos constituem uma matriz "normalizada" reprodutível, eliminando-se a necessidade de encontrar fontes de sedimentos limpos e não contaminados,

   — os ensaios podem ser iniciados em qualquer momento, eliminando-se assim a variabilidade sazonal dos sedimentos ensaiados, não havendo necessidade de pré-tratar os sedimentos para remover a fauna indígena; a utilização de sedimentos formulados reduz também os custos associados à colheita no terreno de quantidades suficientes de sedimentos para os ensaios de rotina,

▼M4

— a utilização de sedimentos formulados permite ainda efetuar comparações de toxicidade e classificar as substâncias em conformidade. Os dados de toxicidade obtidos a partir de ensaios com sedimentos naturais e artificiais mostraram-se comparáveis para vários produtos químicos (2).

6. São definidos no apêndice 1 alguns conceitos utilizados.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

7. Expõe-se larvas de quironomídeos do primeiro estádio larvar a uma gama de concentrações da substância em estudo em sistemas sedimentos-água. O ensaio inicia-se com a colocação de larvas do primeiro estádio larvar nos copos de ensaio com o sistema sedimentos-água, adicionando-se posteriormente a substância em estudo à água. A emergência de quironomídeos e as respetivas taxas de desenvolvimento são medidas no final do ensaio. Se necessário, a sobrevivência e o peso das larvas podem também ser determinados decorridos 10 dias, utilizando os replicados adicionais que se justifiquem. Os dados são analisados por recurso a um modelo de regressão, de forma a estimar a concentração que causaria uma redução de x% na emergência, na sobrevivência ou no crescimento das larvas (por exemplo, CE_{15}, CE_{50}, etc.), ou utilizando hipóteses estatísticas, para determinar a NOEC/ /LOEC. Este último método exige a comparação de valores que produzem efeitos com valores de controlo, por recurso a testes estatísticos.

INFORMAÇÕES SOBRE A SUBSTÂNCIA EM ESTUDO

8. Devem ser conhecidas a solubilidade em água e a pressão de vapor da substância em estudo, bem como a partição nos sedimentos medida ou calculada e a estabilidade na água e nos sedimentos. Para a quantificação da substância em estudo na água sobrenadante, na água dos poros e nos sedimentos, deve dispor-se de um método analítico fiável, com exatidão e limite de deteção conhecidos e documentados. A fórmula estrutural e o grau de pureza da substância constituem igualmente informações úteis. O comportamento químico da substância em estudo (p. ex.: dissipação, degradação abiótica ou biótica, etc.) é também uma informação importante. Para mais orientações sobre o ensaio de substâncias cujas propriedades físico-químicas dificultam a realização dos ensaios, consultar a referência bibliográfica (12).

PRODUTOS QUÍMICOS DE REFERÊNCIA

9. Pode testar-se periodicamente produtos químicos de referência com o objetivo de garantir a fiabilidade do protocolo e das condições de ensaio. As seguintes substâncias constituem exemplos de substâncias tóxicas de referência utilizadas com êxito em ensaios interlaboratoriais e em estudos de validação: lindano, trifluralina, pentaclorofenol, cloreto de cádmio e cloreto de potássio (1)(2)(5)(6)(13).

VALIDADE DO ENSAIO

10. Um ensaio é considerado válido se forem cumpridas as seguintes condições:

— a emergência nos controlos deve ser de, pelo menos, 70 % no final do ensaio (1)(6),

— a emergência de indivíduos adultos das espécies *C. riparius* e *C. yoshimatsui* nos recipientes de controlo deve ocorrer 12 a 23 dias após a inserção destas espécies nos recipientes; no caso da *C. tentans*, é necessário um período de 20 a 65 dias,

— no final do ensaio, devem determinar-se o pH e a concentração de oxigénio dissolvido em cada recipiente. A concentração de oxigénio deve ser de, pelo menos, 60 % do valor da saturação com ar (VSA) à temperatura utilizada e o pH da água sobrenadante deve estar compreendido entre 6 e 9, em todos os recipientes de ensaio,

▼M4

— a temperatura da água não deve variar mais de ± 1,0 °C. Esta temperatura pode ser controlada numa sala isotérmica, caso em que a temperatura ambiente deve ser confirmada a intervalos adequados.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Recipientes de ensaio

11. O estudo é realizado em copos de vidro de 600 ml, com 8 cm de diâmetro. Podem utilizar-se outros recipientes, devendo contudo assegurar-se uma espessura adequada da água sobrenadante e dos sedimentos. A superfície dos sedimentos deve proporcionar 2 a 3 cm^2 por cada larva. O rácio entre a espessura da camada de sedimentos e a espessura da água sobrenadante deve ser de 1:4. Os recipientes de ensaio e o restante equipamento que entre em contacto com o sistema de ensaio devem ser exclusivamente de vidro ou de outro material quimicamente inerte (p. ex., Teflon).

Seleção das espécies

12. A espécie a utilizar de preferência no ensaio é a *Chironomus riparius*. A espécie *Chironomus tentans* também é adequada, mas é mais difícil de manipular e exige um período de ensaio mais longo. Pode igualmente utilizar-se a *Chironomus yoshimatsui*. O apêndice 2 apresenta informações sobre os métodos de cultura de *Chironomus riparius*. Estão também disponíveis informações sobre as condições de cultura das espécies *Chironomus tentans* (4) e *Chironomus yoshimatsui* (11). A identidade das espécies deve ser confirmada antes do ensaio, exceto no caso de organismos provenientes de uma cultura interna do laboratório.

Sedimentos

13. Devem ser utilizados, de preferência, sedimentos formulados (reconstituídos, artificiais ou sintéticos). Contudo, se forem utilizados sedimentos naturais, estes devem ser caracterizados (pelo menos pH e teor de carbono orgânico, recomendando-se a determinação de outros parâmetros, tais como a razão C/N e a granulometria) e devem estar isentos de qualquer contaminação e de outros organismos que possam competir com os quironomídeos ou consumi-los. Recomenda-se igualmente que, antes de serem utilizados num ensaio de toxicidade em quironomídeos, os sedimentos naturais sejam acondicionados durante sete dias em condições semelhantes às do ensaio subsequente. Recomenda-se que sejam utilizados no presente ensaio (1)(15)(16) sedimentos formulados com a seguinte composição, baseada na do solo artificial utilizado no método C.8 (14):

a) 4-5 % (massa seca) de turfa: pH tão próximo quanto possível do intervalo 5,5-6,0; é importante utilizar turfa em pó, finamente moída (granulometria das partículas ≤ 1 mm), unicamente seca ao ar;

b) 20 % (massa seca) de argila caulinítica, de preferência com teor de caulinite superior a 30 %;

c) 75-76 % (massa seca) de areia quartzítica, com predominância de areia fina com mais de 50 % de partículas de granulometria compreendida entre 50 e 200 μm;

d) a quantidade de água desionizada necessária para que o teor de humidade da mistura final se situe na gama 30-50 %;

e) a quantidade de carbonato de cálcio ($CaCO_3$) quimicamente puro necessária para ajustar o pH da mistura final dos sedimentos a 7,0 ± 0,5;

f) teor de carbono orgânico da mistura final: 2 % ± 0,5 %, devendo ser ajustado por recurso a quantidades adequadas de turfa e areia, em conformidade com as alíneas a) e c).

▼M4

14. As origens da turfa, da argila caulinítica e da areia devem ser conhecidas. Deve verificar-se a ausência de contaminação química (p. ex., metais pesados, compostos organoclorados, compostos organofosforados, etc.) nos componentes dos sedimentos. No apêndice 3, apresenta-se um exemplo de preparação de sedimentos. Uma mistura de componentes secos também é aceitável caso se demonstre que, após a adição da água sobrenadante, não ocorre separação de componentes dos sedimentos (por exemplo, partículas de turfa flutuantes) e que a turfa ou os sedimentos estão suficientemente acondicionados.

Água

15. Qualquer água com as características químicas de uma água de diluição aceitável enunciadas nos apêndices 2 e 4 é adequada para o ensaio. Para a cultura e o ensaio, pode utilizar-se qualquer água adequada, água natural (superficial ou subterrânea), água reconstituída (ver o apêndice 2) ou água da rede de abastecimento desclorada, desde que os quironomídeos nela sobrevivam durante todo o período de cultura e de ensaio sem evidenciarem sinais de *stress*. No início do ensaio, o pH da água de ensaio deve estar compreendido entre 6 e 9 e a dureza total da água, expressa em $CaCO_3$, não deve exceder 400 mg/l. No entanto, caso se suspeite de uma interação entre os iões responsáveis pela dureza e a substância em estudo, deve utilizar-se uma água de dureza inferior (nessa eventualidade, o meio Elendt M4 não pode ser utilizado). Deve utilizar-se o mesmo tipo de água em todo o estudo. As características de qualidade da água enumeradas no apêndice 4 devem ser determinadas pelo menos duas vezes por ano, ou sempre que se suspeite que tenham mudado significativamente.

Soluções-mãe — água enriquecida

16. As concentrações de ensaio são calculadas com base nas concentrações da água da coluna de água, ou seja, da água sobrenadante dos sedimentos. De um modo geral, as soluções de ensaio com as concentrações escolhidas são preparadas por diluição de uma solução-mãe. As soluções-mãe devem ser preparadas, de preferência, por dissolução da substância em estudo no meio de ensaio. Em alguns casos, pode ser necessária a utilização de solventes ou dispersantes para produzir uma solução-mãe com a concentração adequada. A acetona, o etanol, o metanol, os éteres mono e dimetílico do etilenoglicol, a dimetilformamida e o trietilenoglicol constituem exemplos de solventes que podem ser utilizados. No que respeita aos dispersantes, podem utilizar-se o Cremophor RH40, o Tween 80, a metilcelulose a 0,01 % e o HCO-40. A concentração do agente solubilizante no meio de ensaio final deve ser mínima (ou seja, $\leq$ 0,1 ml/l) e deve ser a mesma para todas as concentrações de exposição. Sempre que se utilize um agente solubilizante, este não deve apresentar efeitos significativos na sobrevivência das larvas de quironomídeos, nem efeitos adversos observáveis nas mesmas, a confirmar por meio de um controlo do solvente. No entanto, como se referiu acima, devem fazer-se todos os esforços para evitar utilizar tais produtos.

PLANEAMENTO DO ENSAIO

17. O planeamento do ensaio consiste na escolha do número e dos intervalos das concentrações de ensaio, do número de recipientes para cada concentração e do número de larvas por recipiente. Descreve-se de seguida o método de estimativa de pontos CE e do NOEC, bem como de realização de ensaios do limite. A análise por regressão linear é preferível à abordagem por testes de hipóteses.

Análise por regressão linear

18. As concentrações testadas no ensaio deverão incluir as concentrações às quais se observam efeitos (por exemplo, CE_{15} e CE_{50}) e abranger a gama de concentrações para as quais o efeito da substância em estudo é significativo. De modo geral, é possível melhorar a exatidão e, em especial, a validade das estimativas das concentrações que produzem efeitos (CE_x) se

▼M4

essas concentrações se situarem na gama de concentrações ensaiadas. Devem evitar-se extrapolações muito abaixo da concentração positiva mais baixa ou acima da concentração mais elevada. É útil efetuar um ensaio exploratório preliminar para a escolha da gama de concentrações a utilizar no ensaio (ver o ponto 27).

19. Caso se pretenda estimar uma CE_x, devem ser utilizados, pelo menos, cinco concentrações e três replicados de cada concentração. Em qualquer caso, para obter uma boa estimativa, é aconselhável ensaiar um número suficiente de concentrações. O fator entre as concentrações não deve ser superior a dois (salvo se a curva de resposta à dose tiver um declive reduzido). Pode reduzir-se o número de replicados de cada concentração se for aumentado o número de concentrações de ensaio com respostas diferentes. O aumento do número de replicados ou a redução dos intervalos entre concentrações intervalos produz, em geral, intervalos de confiança mais estreitos. Caso se pretenda estimar a sobrevivência e o crescimento das larvas a 10 dias, é necessário utilizar mais replicados.

Estimativa do NOEC/LOEC

20. Caso se pretenda estimar o NOEC ou o LOEC, devem ensaiar-se cinco concentrações com, pelo menos, quatro replicados, não devendo o fator entre as concentrações ser superior a dois. O número de replicados deverá ser suficiente para garantir a possibilidade estatística de detetar de forma adequada uma diferença de 20 % relativamente à concentração de controlo, com um grau de significância de 5 % (p = 0,05). No respeitante às taxas de desenvolvimento, é geralmente adequada uma análise de variância (ANOVA), como o teste de Dunnett ou o teste de Williams (17)(18)(19)(20). Quanto à taxa de emergência, podem utilizar-se o teste de Cochran-Armitage, o teste exato de Fisher (com a correção de Bonferroni) ou o teste de Mantel-Haentzal.

Ensaio do limite

21. Caso não sejam detetados efeitos no ensaio exploratório preliminar de seleção das concentrações, pode proceder-se a um ensaio do limite (uma concentração de ensaio e uma de controlo). O objetivo do ensaio do limite consiste em provar que as concentrações tóxicas da substância em estudo são superiores à concentração máxima ensaiada. No âmbito do presente método de ensaio, não é possível sugerir nenhuma concentração a recomendar; esse critério é deixado à apreciação das entidades regulamentadoras. Em geral, são necessários, pelo menos, seis replicados dos organismos expostos e de controlo. Deve comprovar-se existir a possibilidade estatística de detetar de forma adequada uma diferença de 20 % relativamente ao controlo, com um grau de significância de 5 % (p = 0,05). No que respeita ao efeito nas taxas de desenvolvimento e na massa, o teste *t* é um método estatístico adequado se os dados cumprirem os requisitos do teste (normalidade e variâncias homogéneas). Se estes requisitos não forem preenchidos, pode utilizar-se um teste *t* de variância desigual ou um teste não paramétrico, como o de Wilcoxon-Mann-Whithey. No que respeita à taxa de emergência, o teste exato de Fisher é adequado.

PROCEDIMENTO

Condições de exposição

Preparação do sistema água enriquecida-sedimentos

22. Coloca-se nos recipientes de ensaio quantidades adequadas de sedimentos formulados (ver os pontos 13-14 e o apêndice 3), de modo a formar uma camada com, pelo menos, 1,5 cm de espessura. Junta-se água numa espessura de 6 cm (ver o ponto 15). A razão entre a espessura da camada de sedimentos e a espessura da camada de água não deve exceder 1:4; a espessura da camada de sedimentos não deve exceder 3 cm. O sistema sedimentos-água deve ser sujeito a um arejamento ligeiro durante sete dias, antes da introdução dos organismos em estudo (ver o ponto 14 e o apêndice 3). Para evitar a separação de componentes dos sedimentos e a ressuspensão de materiais finos durante a criação da coluna de água, os sedimentos podem ser cobertos, enquanto a água é vertida, com um disco de plástico que se remove imediatamente depois. Podem também utilizar-se outros dispositivos.

▼M4

23. Os recipientes de ensaio devem ser cobertos (por exemplo, com placas de vidro). Se necessário, o nível inicial de água pode ser reposto durante o ensaio, para compensar a evaporação. Para tal, deve utilizar-se água destilada ou desionizada, de modo a evitar a acumulação de sais.

Introdução dos organismos em estudo

24. Quatro a cinco dias antes da introdução dos organismos em estudo nos recipientes de ensaio, deve colher-se aglomerados de ovos das culturas e colocá-los em pequenos recipientes com o meio de cultura. Pode utilizar-se meio proveniente da cultura-mãe ou um meio recentemente preparado. Neste último caso, importa adicionar ao meio de cultura uma pequena quantidade de alimentos, como, por exemplo, algas verdes e/ou algumas gotas de filtrado de uma suspensão de alimento para peixes finamente moído (ver o apêndice 2). Apenas devem ser utilizados aglomerados de ovos de postura recente. Normalmente, as larvas começam a eclodir alguns dias após a postura dos ovos (2 a 3 dias, a 20 °C, no caso das *Chironomus riparius*, e 1 a 4 dias no caso das *Chironomus tentans*, a 23 °C, e das *Chironomus yoshimatsui*, a 25 °C); o crescimento das larvas ocorre em quatro estádios larvares, cada um com a duração de 4 a 8 dias. Utilizar no ensaio larvas do primeiro estádio larvar (2-3 ou 1-4 dias após a eclosão). O estádio larvar dos insetos pode, eventualmente, ser verificado por exame da largura da cápsula cefálica (6).

25. Com o auxílio de uma pipeta embotada, coloca-se aleatoriamente vinte larvas do primeiro estádio larvar em cada recipiente de ensaio contendo os sedimentos e a água. O arejamento da água tem de ser suspenso durante a colocação das larvas nos recipientes de ensaio, assim permanecendo nas 24 horas subsequentes a esta operação (ver os pontos 24 e 32). Consoante o tipo de ensaio realizado (ver os pontos 19 e 20), o número de larvas por concentração deve ser, no mínimo, de 60, no caso de estimativas de pontos CE, e de 80, no caso das determinações de NOEC.

26. Vinte e quatro horas após a introdução das larvas, a coluna de água sobrenadante é enriquecida com a substância em estudo, retomando-se um arejamento ligeiro. Com o auxílio de uma pipeta, introduzem-se pequenos volumes da solução da substância em estudo abaixo da superfície da água. A água sobrenadante deve, em seguida, ser homogeneizada com cuidado, para não perturbar os sedimentos.

Concentrações de ensaio

27. Pode ser útil efetuar um ensaio exploratório para a determinação da gama de concentrações a utilizar no ensaio definitivo. Para o efeito, recorre-se a uma série de concentrações espaçadas da substância em estudo. Garantido que a densidade de quironomídeos por unidade de superfície seja idêntica à utilizada no ensaio definitivo, os quironomídeos são expostos a cada concentração da substância em estudo por um período que permita uma estimativa das concentrações de ensaio adequadas, não sendo necessários replicados.

28. As concentrações a utilizar no ensaio definitivo são decididas com base nos resultados do ensaio exploratório. Devem ser utilizadas pelo menos cinco concentrações, selecionadas do modo descrito nos pontos 18 a 20.

Controlos

29. Deve utilizar-se no ensaio um número adequado de recipientes de controlo sem a substância em estudo, mas com os sedimentos (ver os pontos 19-20). Caso se recorra a um solvente para a incorporação da substância em estudo (ver o ponto 16), deve efetuar-se um controlo utilizando sedimentos com solvente.

▼M4

Sistema de ensaio

30. São utilizados sistemas estáticos. Em casos excecionais, pode utilizar-se sistemas semiestáticos ou sistemas de escoamento com renovação intermitente ou contínua da água sobrenadante, por exemplo, se as características de qualidade da água se tornarem inadequadas ao organismo em estudo ou afetarem o equilíbrio químico (isto é, se os teores de oxigénio dissolvido baixarem demasiado, se a concentração de produtos de excreção aumentar demasiado, se ocorrer lixiviação de minerais dos sedimentos que afete o pH e/ou dureza da água, etc.). Deve preferir-se, contudo, o recurso a outros métodos para melhorar a qualidade da água sobrenadante, como o arejamento, que é, em geral, suficiente.

Alimentação

31. É necessário alimentar as larvas, de preferência diariamente ou, no mínimo, três vezes por semana. Utilizar alimento para peixes (suspensão em água ou finamente moído, por exemplo, Tetra Min or Tetra-Phyll; ver pormenores no apêndice 2); a quantidade de 0,25-0,5 mg (0,35-0,5 mg no caso de *C. yoshimatsui*) por larva e dia afigura-se adequada para as larvas jovens, nos primeiros 10 dias. Após este período, pode ser necessária uma quantidade ligeiramente superior: 0,5-1 mg por larva e dia deve bastar para o resto do ensaio. A ração alimentar deve ser reduzida a todos os organismos expostos e aos controlos caso se observe crescimento fúngico ou se verifique mortalidade nos controlos. Se não for possível impedir o crescimento fúngico, deve repetir-se o ensaio. Quando se estuda substâncias fortemente adsorventes (por exemplo, com log K_{ow} > 5) ou substâncias ligadas aos sedimentos por ligações covalentes, a quantidade de alimentos necessária para assegurar a sobrevivência e o crescimento natural dos organismos pode ser adicionada aos sedimentos formulados, antes do período de estabilização. Para esse fim, devem ser utilizados matérias vegetais em vez de alimentos para peixes; a título de exemplo, 0,5 % (massa seca) de folhas finamente moídas de espécies como a urtiga comum (*Urtica dioeca*), a amoreira (*Morus alba*), o trevo branco (*Trifolium repens*), o espinafre (*Spinacia oleracea*) ou outras matérias de origem vegetal (*Cerophyl* ou α-celulose).

Condições de incubação

32. O arejamento ligeiro da água sobrenadante nos recipientes de ensaio deve iniciar-se, de preferência, 24 horas após a introdução das larvas, prosseguindo ao longo de todo o ensaio (deve evitar-se que a concentração de oxigénio dissolvido baixe para valores inferiores a 60 % do VSA). O arejamento é efetuado por intermédio de uma pipeta de Pasteur de vidro, fixada 2-3 cm acima da camada de sedimentos (caudal: uma ou poucas bolhas por segundo). No ensaio de produtos químicos voláteis, pode optar-se por não arejar o sistema sedimentos-água.

33. O ensaio é realizado a temperatura constante (20 °C ± 2 °C). No caso das espécies *C. tentans* e *C. yoshimatsui*, as temperaturas recomendadas são 23 °C e 25 °C (± 2 °C), respetivamente. Utiliza-se um período de irradiação de 16 horas, com uma intensidade luminosa de 500 a 1 000 lux.

Duração da exposição

34. A exposição começa com a introdução das larvas nos recipientes enriquecidos e nos recipientes de controlo. A duração máxima da exposição é de 28 dias para a *C. riparius* e a *C. yoshimatsui* e de 65 dias para a *C. tentans*. Se os insetos emergirem precocemente, pode pôr-se termo ao ensaio, no mínimo, cinco dias após a emergência do último indivíduo adulto nos recipientes de controlo.

OBSERVAÇÕES

Emergência

35. Determina-se o tempo de desenvolvimento e o número total de insetos machos e fêmeas totalmente emergidos. Os machos são facilmente identificados pelas suas antenas plumosas.

▼M4

36. Os recipientes de ensaio devem ser observados pelo menos três vezes por semana, a fim de apreciar visualmente qualquer comportamento anormal (por exemplo, saída dos sedimentos, natação anormal) em relação aos recipientes de controlo. Durante o período de emergência previsto, é necessário proceder à contagem diária dos insetos emergidos. O sexo e o número de insetos totalmente emergidos são registados diariamente. Após a identificação, removem-se os insetos dos recipientes. Quaisquer aglomerados de ovos postos antes do termo do ensaio devem ser registados e, de seguida, removidos, para evitar a reintrodução de larvas nos sedimentos. Regista-se também o número de ninfas visíveis que não emergiram. O apêndice 5 contém orientações sobre a mensuração da emergência.

Crescimento e sobrevivência

37. Se for necessário obter dados sobre a sobrevivência e o crescimento das larvas em dez dias, deve prever-se recipientes de ensaio suplementares desde o início, para que possam ser utilizados posteriormente. Os sedimentos destes recipientes são passados por um crivo com abertura de malha de 250 μm, para reter as larvas. Os critérios de morte são a imobilidade e a ausência de reação a estímulos mecânicos. As larvas não recuperadas devem também ser contadas como mortas (as larvas que morreram no início do ensaio podem ter sido degradadas por micróbios). Determina-se a massa seca, isenta de cinzas, de larvas sobreviventes em cada recipiente de ensaio, calculando-se a massa seca média por recipiente. É útil determinar o estádio larvar das larvas sobreviventes; para tal, pode recorrer-se à medição da largura da cápsula cefálica de cada indivíduo.

Determinações analíticas

Concentração da substância em estudo

38. No início (de preferência uma hora após a aplicação da substância) e no final do ensaio, é necessário analisar, no mínimo, amostras da água sobrenadante, da água dos poros e dos sedimentos correspondentes à concentração mais elevada e a uma concentração inferior. Estas determinações da concentração da substância em estudo proporcionam informações sobre o comportamento e/ou a partição da mesma no sistema água-sedimentos. A colheita de amostras dos sedimentos no início do ensaio pode influenciar o sistema (por exemplo, remoção de larvas), pelo que devem ser utilizados recipientes de ensaio adicionais para a realização das determinações analíticas no início e durante o ensaio, se pertinente (ver o ponto 39). Pode não ser necessário efetuar medições nos sedimentos, caso a partição da substância em estudo entre a água e os sedimentos tenha sido claramente determinada num estudo em condições comparáveis (por exemplo, coeficiente de partição sedimentos/ /água, tipo de aplicação, teor de carbono orgânico dos sedimentos).

39. Quando se efetua medições intermédias (por exemplo, no 7.º dia) e a análise necessita de amostras grandes que não podem ser colhidas dos recipientes de ensaio sem influenciar o sistema em estudo, as determinações analíticas devem ser realizadas com amostras colhidas de recipientes de ensaio suplementares tratados da mesma forma (incluindo a presença dos organismos em estudo), mas que não são alvo de observações biológicas.

40. A centrifugação a cerca de 10 000 g e 4 °C, durante 30 minutos, é o procedimento recomendado para isolar a água intersticial. No entanto, caso se demonstre que a substância em estudo não é adsorvida aos filtros, a filtragem também é aceitável. Em alguns casos, se a amostra for demasiado pequena, poderá não ser possível analisar concentrações na água dos poros.

▼M4

Parâmetros físico-químicos

41. O pH, o teor de oxigénio dissolvido na água e a temperatura dos recipientes de ensaio devem ser medidos de forma adequada (ver o ponto 10). A dureza e o ião amónio devem ser medidos nos recipientes de controlo e num recipiente de ensaio com a concentração mais elevada, no início e no final do ensaio.

DADOS E RELATÓRIOS

Tratamento dos resultados

42. O objetivo deste ensaio consiste em determinar o efeito da substância em estudo nas taxas de desenvolvimento e no número total de insetos machos e fêmeas totalmente emergidos ou, no caso dos ensaios de 10 dias, os efeitos na sobrevivência e no peso das larvas. Se não houver indicação de sensibilidades estatisticamente diferentes entre os sexos, os resultados relativos aos machos e às fêmeas podem ser agrupados para efeitos de análise estatística. As diferenças de sensibilidade entre os sexos podem ser avaliadas estatisticamente, por exemplo, recorrendo a um ensaio de tabela de contingência χ^2-r x 2. Se necessário, determina-se a sobrevivência das larvas e a massa seca por recipiente após 10 dias.

43. As concentrações com efeitos, expressas em relação à água sobrenadante, são calculadas de preferência a partir das concentrações medidas nos sedimentos no início do ensaio (ver o ponto 38).

44. Para efetuar uma estimativa pontual do valor CE_{50} ou de qualquer valor CE_x, podem equiparar-se os dados estatísticos por recipiente aos de ensaios idênticos reais. No cálculo de um intervalo de confiança para qualquer valor CE_x, importa ter em conta a variabilidade entre recipientes, ou deve demonstrar-se que essa variabilidade é tão reduzida que pode ser ignorada. Se o modelo for ajustado pelo método dos mínimos quadrados, deve aplicar-se uma transformação aos dados estatísticos por recipiente, para melhorar a homogeneidade da variância. Contudo, os valores de CE_x só devem ser calculados após retransformação da resposta no valor original.

45. Se a análise estatística tiver por objetivo determinar o NOEC/LOEC utilizando hipóteses estatísticas, importa ter em conta a variabilidade entre recipientes, por exemplo, aplicando um método ANOVA hierarquizado. Se não se verificarem os pressupostos comuns do método ANOVA, testes mais robustos podem constituir uma alternativa adequada (21).

Taxa de emergência

46. As taxas de emergência são dados de "tudo ou nada", que podem ser analisados através de um teste de Cochran-Armitage aplicado de forma regressiva, nos casos em que se prevê uma relação monótona entre a dose fornecida e a resposta e os dados são compatíveis com a previsão. Caso contrário, pode recorrer-se a um teste exato de Fisher ou a um teste de Mantel-Haentzal com valores *p* ajustados segundo o método de Bonferroni-Holm. Se, para a mesma concentração, houver indícios de uma maior variabilidade entre replicados do que a sugerida por uma distribuição binomial (frequentemente referida como variação "extrabinomial"), deve utilizar-se um teste exato de Fisher ou um teste de Cochran-Armitage robusto, como proposto na referência 21.

47. Determina-se a soma dos insetos emergidos por recipiente, ne, que é seguidamente dividida pelo número de larvas nele introduzidas, na:

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

▼M4

em que:

ER = Taxa de emergência

n_e = Número de insetos emergidos no recipiente

n_a = Número de larvas introduzidas no recipiente

48. Uma alternativa mais adequada a amostras grandes, quando se regista variância extrabinomial, consiste em considerar a taxa de emergência uma resposta contínua e aplicar procedimentos como o teste de William, caso se preveja uma relação monótona entre a dose fornecida e a resposta, compatível com os dados de taxa de emergência em causa. Por seu turno, o teste de Dunnett é adequado aos casos em que não se regista uma relação monótona. Neste contexto, uma amostra "grande" é definida como aquela em que o número total de insetos emergidos e não emergidos é superior a cinco por replicado (recipiente).

49. A aplicação de métodos ANOVA implica que os valores de taxa de emergência sejam sujeitos a uma transformação de arco-seno da raiz quadrada ou a uma transformação de Tukey-Freeman, de forma a obter uma distribuição aproximadamente normal e uniformizar as variâncias. Os testes de Cochran-Armitage, exato de Fisher (Bonferroni) e Mantel-Haentzal podem ser aplicados quando se utilizam frequências absolutas. A transformação de arco-seno da raiz quadrada consiste em calcular o inverso do seno (sin^{-1}) da raiz quadrada do valor da taxa de emergência.

50. No respeitante às taxas de emergência, os valores de CE_x são calculados por análise de regressão — por exemplo, por recurso aos modelos *probit* (22), *logit* ou Weibull ou a programas informáticos comerciais adequados). Em caso de fracasso da análise de regressão (por exemplo, se o número de respostas parciais for inferior a dois), utilizam-se outros métodos não paramétricos, como a média móvel ou a simples interpolação.

Taxa de desenvolvimento

51. O tempo médio de desenvolvimento representa o tempo médio decorrido entre a introdução das larvas (dia 0 do ensaio) e a emergência da coorte experimental de insetos (para o cálculo do tempo de desenvolvimento real, é necessário ter em conta a idade das larvas no momento da introdução). A taxa de desenvolvimento é o inverso do tempo de desenvolvimento (unidade: 1/dia) e representa a quantidade de desenvolvimento larvar que ocorre por dia. A taxa de desenvolvimento é o parâmetro preferido para a avaliação destes estudos de toxicidade dos sedimentos, dado que a sua variância é mais baixa que a do tempo de desenvolvimento, sendo também mais homogénea e mais próxima da distribuição normal. Os testes paramétricos mais potentes estão mais adaptados à taxa de desenvolvimento do que ao tempo de desenvolvimento. Considerando a taxa de desenvolvimento uma resposta contínua, os valores de CE_x podem ser estimados por recurso a uma análise de regressão – por exemplo, como descrito em 23 e 24.

52. No contexto dos testes estatísticos que se seguem, considera-se que o número de insetos observado no dia de inspeção x emergiu no ponto médio do intervalo de tempo compreendido entre o dia x e o dia x-d (d = duração do intervalo de inspeção, em geral 1 dia). A taxa de desenvolvimento média por recipiente (é calculada com base nas seguintes equações:

$$\overline{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i x_i}{n_e}$$

em que:

$\overline{x}$: Taxa de desenvolvimento média por recipiente

i: Índice do intervalo de inspeção

m: Número máximo de intervalos de inspeção

▼M4

f_i: Número de insetos emergidos no intervalo de inspeção *i*

n_e: Número de insetos emergidos no final do ensaio ($=\sum f_i$)

x_i: Taxa de desenvolvimento dos insetos emergidos no intervalo *i*

$$x_i = 1/\left(day_i - \frac{l_i}{2}\right)$$

em que:

dia_i: Dia de inspeção (n.º de dias decorridos desde a introdução dos organismos)

d_i: Duração do intervalo de inspeção *i* (dias, normalmente 1 dia)

Relatório dos ensaios

53. O relatório dos ensaios deve incluir, no mínimo, as seguintes informações:

Substância em estudo:

— natureza física e, quando pertinente, propriedades físico-químicas (solubilidade na água, pressão de vapor, coeficiente de partição no solo — ou nos sedimentos, se disponível —, estabilidade em água, etc.),

— dados de identificação química (denominação comum, denominação química, fórmula estrutural, número CAS, etc.), incluindo o grau de pureza e o método analítico de quantificação da substância.

Espécies utilizadas nos ensaios:

— animais: espécie, nome científico, origem dos organismos e condições de reprodução,

— informações sobre o manuseamento dos aglomerados de ovos e das larvas,

— idade dos animais quando introduzidos nos recipientes de ensaio.

Condições experimentais:

— sedimentos utilizados, isto é, de origem natural ou formulados,

— no caso dos sedimentos naturais, localização e descrição do local de colheita, incluindo, se possível, o historial de contaminação; características: pH, teor de carbono orgânico, razão C/N e granulometria (se pertinente),

— preparação dos sedimentos formulados: ingredientes e características (teor de carbono orgânico, pH, humidade, etc., no início dos ensaios),

— preparação da água para os ensaios, caso seja utilizada água reconstituída, e respetivas características (concentração de oxigénio, pH, condutividade, dureza, etc., no início dos ensaios);

— espessura dos sedimentos e da água sobrenadante,

— volume de água sobrenadante e de água dos poros; massa do sedimento húmido com e sem a água dos poros,

— recipientes de ensaio (material e dimensões),

— método de preparação das soluções-mãe e concentrações de ensaio,

▼M4

— aplicação da substância em estudo: concentrações de ensaio utilizadas, número de replicados e solvente utilizado, se for o caso,

— condições de incubação: temperatura, ciclo de luz e intensidade luminosa, arejamento (frequência e intensidade),

— informações pormenorizadas sobre a alimentação dos organismos, incluindo o tipo de alimentos, a preparação, a quantidade e o regime alimentar.

Resultados:

— concentrações de ensaio nominais, concentrações de ensaio medidas e resultados de todas as análises efetuadas para determinar a concentração da substância em estudo nos recipientes de ensaio,

— qualidade da água nos recipientes de ensaio (pH, temperatura, oxigénio dissolvido, dureza e teor de ião amónio),

— renovação da água evaporada nos ensaios, se for o caso,

— número de insetos machos e fêmeas emergidos por recipiente e dia,

— número de larvas que não originaram insetos, por recipiente,

— massa seca média de larvas por recipiente e, se for caso disso, por estádio larvar,

— percentagem de emergência por replicado e por concentração de ensaio (machos e fêmeas no seu conjunto),

— taxa média de desenvolvimento de insetos totalmente emergidos por replicado e por concentração de ensaio (machos e fêmeas no seu conjunto),

— estimativas de parâmetros de toxicidade, como, por exemplo, CE_x (e os intervalos de confiança associados), NOEC e/ou LOEC, e métodos estatísticos utilizados para a determinação dos mesmos,

— discussão dos resultados, incluindo qualquer influência nos resultados do ensaio decorrente de alterações efetuadas ao presente método de ensaio.

REFERÊNCIAS:

(1) BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Editado por M. Streloke e H. Köpp. Berlim, 1995.

(2) Fleming R. *et al.* (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Final Report to the European Commission. Report No: EC 3738. Agosto de 1994. WRc, Reino Unido.

(3) SETAC (1993). Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. WOSTA Workshop realizado nos Países Baixos.

(4) ASTM International/E1706-00 (2002). Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. p. 1125-1241. *In* ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International. West Conshohocken, PA.

(5) Environment Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. Dezembro de 1997.

(6) US-EPA (2000). Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Segunda edição. EPA 600/R-99/064. Março de 2000. Revisão da primeira edição, de junho de 1994.

▼**M4**

(7) US-EPA/OPPTS 850.1735. (1996): Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.

(8) US-EPA/OPPTS 850.1790. (1996): Chironomid Sediment toxicity Test.

(9) Milani D., Day K.E., McLeay D.J., Kirby R.S. (1996). Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods *(Hyalella azteca)* and midge larvae *(Chironomus riparius)*. Technical Report. Environment Canada. National Water Research Institute. Burlington, Ontário, Canadá.

(10) Sugaya Y. (1997). Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides *in Chironomus yoshimatsui*. *Jp. J. Sanit. Zool.* 48 (4): 345-350.

(11) Kawai K. (1986). Fundamental studies on Chironomid allergy. I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera). *Jp. J. Sanit. Zool.* 37(1): 47-57.

(12) OCDE (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

(13) Environment Canada (1995). Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant. Report EPS 1/RM/30. Setembro de 1995.

(14) Capítulo C.8 deste anexo: Toxicidade em relação às minhocas.

(15) Suedel B.C., Rodgers J.H. (1994). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. *Environ. Toxicol. Chem.* 13: 1163-1175.

(16) Naylor C., Rodrigues C. (1995). Development of a test method for Chironomus riparius using a formulated sediment. *Chemosphere* 31: 3291-3303.

(17) Dunnett C.W. (1964). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statis. Assoc.* 50: 1096-1121.

(18) Dunnett C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics* 20: 482-491.

(19) Williams D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics* 27: 103-117.

(20) Williams D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics* 28: 510-531.

(21) Rao J.N.K., Scott A.J. (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. *Biometrics* 48:577-585.

(22) Christensen E.R. (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. *Water Research* 18: 213-221.

(23) Bruce, Versteeg (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environmental Toxicology and Chemistry* 11:1485-1494.

(24) Slob W. (2002). Dose-response modelling of continuous endpoints. *Toxicol. Sci.* 66: 298-312.

▼**M4**

Apêndice 1

DEFINIÇÕES

No âmbito do presente método, aplica-se as seguintes definições:

Sedimentos formulados ou reconstituídos, artificiais ou sintéticos: mistura de matérias utilizadas para simular os componentes físicos de sedimentos naturais.

Água sobrenadante: água situada acima da superfície dos sedimentos, no recipiente de ensaio.

Água intersticial ou água dos poros: água que ocupa o espaço entre as partículas de sedimentos e de solo.

Água enriquecida: água utilizada no ensaio, à qual foi adicionada a substância em estudo.

Produto químico em estudo: qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado o presente método de ensaio.

▼M4

Apêndice 2

Recomendações para a cultura de *Chironomus riparius*

1. As larvas de *Chironomus* podem ser criadas em caixas de cristalização ou recipientes de maiores dimensões. Espalha-se no fundo do recipiente areia quartzítica fina de modo a constituir uma camada fina com 5 a 10 mm de espessura. Verificou-se que o *kieselguhr* (p. ex. Merck 8117) é também um substrato adequado; neste caso, pode utilizar-se uma camada mais fina, da ordem de poucos milímetros. Adiciona-se de seguida uma coluna de vários centímetros de uma água adequada. Se necessário, os níveis de água podem ser repostos para compensar a evaporação e evitar a dessecação. A água pode ser substituída, se necessário. Deve efetuar-se um arejamento ligeiro. Os recipientes de criação das larvas devem ser mantidos em gaiolas adequadas, de forma a evitar fugas de adultos emergentes. A gaiola deve ser suficientemente grande (no mínimo, cerca de 30 x 30 x 30 cm), para permitir a enxameação dos adultos emergidos, sem o que poderá não ocorrer copulação.

2. As gaiolas devem ser mantidas à temperatura ambiente ou a uma temperatura constante de 20 ± 2 °C, com um período de luminosidade (cerca de 1 000 lux) de 16 horas e oito horas de escuridão. Existem referências documentais de que um teor de humidade relativa do ar inferior a 60 % pode impedir a reprodução.

Água de diluição

3. Pode utilizar-se qualquer água natural ou reconstituída adequada. Utiliza-se em geral água de poços, água da rede de abastecimento desclorada e meios artificiais (por exemplo, meio Elendt M4 ou M7; ver abaixo). A água tem de ser arejada antes da utilização. Se necessário, a água das culturas pode ser renovada por vazamento ou sifonagem cuidadoso da água dos recipientes de cultura, para não destruir os tubos das larvas.

Alimentação das larvas

4. As larvas de *Chironomus* são alimentadas com cerca de 250 mg por recipiente e por dia de um alimento floculado para peixes (Tetra Min®, Tetra Phyll® ou outra marca semelhante). Os alimentos podem ser administrados na forma de um pó seco finamente moído ou de uma suspensão em água: adicionar 1,0 g de alimento floculado a 20 ml de água de diluição e misturar de modo a obter uma mistura homogénea. Esta preparação pode ser administrada ao caudal aproximado de 5 ml por recipiente e por dia (agitar antes da utilização). Pode administrar-se às larvas de idade superior uma maior quantidade de alimento.

5. A alimentação é ajustada em função da qualidade da água. Se o meio de cultura se tornar turvo, deve reduzir-se a alimentação. A administração de alimentos deve ser objeto de um registo minucioso. A escassez de alimentos causaria a migração das larvas para a coluna de água, enquanto uma alimentação demasiado rica aumentaria a atividade microbiana e reduziria a concentração de oxigénio. Ambas estas condições podem resultar numa redução das taxas de crescimento.

6. Ao preparar novos recipientes de cultura, podem também adicionar-se algumas células de algas verdes (por exemplo, *Scenedesmus subspicatus* e *Chlorella vulgaris*).

Alimentação dos adultos emergidos

7. Alguns experimentadores sugeriram que um tampão de algodão embebido numa solução saturada de sacarose pode servir de alimento para os adultos emergidos.

▼M4

Emergência

8. À temperatura de 20 ± 2 °C, os adultos começam a emergir dos recipientes de criação das larvas decorridos 13 a 15 dias. Os machos são facilmente distinguidos pelas suas antenas plumosas.

Aglomerados de ovos

9. Quando se encontrarem presentes adultos nas gaiolas de criação, deve verificar-se três vezes por semana se ocorre a deposição de aglomerados gelatinosos de ovos nos recipientes de criação das larvas. Se tal suceder, devem ser removidos com cuidado e ser transferidos para uma pequena cápsula com uma amostra da água de incubação. Os aglomerados de ovos são utilizados para iniciar novas culturas noutros recipientes (p. ex., 2-4 aglomerados de ovos por recipiente) ou em ensaios de toxicidade.

10. As larvas do primeiro estádio larvar devem eclodir decorridos 2-3 dias.

Preparação de novos recipientes de cultura

11. Quando as culturas estiverem estabelecidas, deverá ser possível preparar um novo recipiente de cultura de larvas por semana, ou com uma frequência menor (consoante os requisitos dos ensaios), removendo os recipientes mais antigos após a emergência dos insetos adultos. O recurso a este sistema permitirá obter um aprovisionamento regular de insetos adultos com uma gestão mínima.

Preparação das soluções de ensaio M4 e M7

12. O meio M4 foi descrito por Elendt (1990). O meio M7 é preparado do mesmo modo que o M4, exceto no que respeita às substâncias indicadas no quadro 1, cujas concentrações são quatro vezes inferiores às do meio M4. Encontra-se em preparação um artigo sobre o meio M7 (Elendt, comunicação pessoal). A solução de ensaio não deve ser preparada em conformidade com as indicações de Elendt e Bias (1990), dado as concentrações de NaSiO3.5H2O, NaNO3, KH2PO4 e K2HPO4 apresentadas para a preparação das soluções-mãe não serem adequadas.

Preparação do meio M7

13. Cada solução-mãe (I) é preparada individualmente, sendo preparada uma solução-mãe combinada (II) a partir dessas soluções (I) (ver o quadro 1). O meio M7 é preparado diluindo para 1 l, com água desionizada, 50 ml da solução-mãe combinada (II) e as quantidades de cada solução-mãe de macronutrientes indicadas no quadro 2. Prepara-se uma solução-mãe de vitaminas juntando três vitaminas a água desionizada, como indicado no quadro 3; adiciona-se 0,1 ml da solução-mãe combinada de vitaminas ao meio M7 final pouco antes da utilização (a solução-mãe de vitaminas é armazenada por congelação, em pequenas alíquotas). O meio é arejado e estabilizado.

Quadro 1

Soluções-mãe de elementos vestigiais para os meios M4 e M7

Soluções-mãe (I)	Quantidade (mg) diluída para 1 litro com água desionizada	Para preparar a solução-mãe combinada (II), misturar as seguintes quantidades (ml) de soluções-mãe (I) e diluir para 1 litro com água desionizada		Concentrações finais nas soluções de ensaio (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3 (1)	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$ (1)	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl (1)	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077

▼**M4**

Soluções-mãe (I)	Quantidade (mg) diluída para 1 litro com água desionizada	Para preparar a solução-mãe combinada (II), misturar as seguintes quantidades (ml) de soluções-mãe (I) e diluir para 1 litro com água desionizada		Concentrações finais nas soluções de ensaio (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
RbCl (1)	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$ (1)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (1)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$ (1)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$ (1)	335	1,0	0,25	0,017	0,004
$ZnCl_2$	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$CaCl_2 \cdot 6\ H_2O$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na_2SeO_3	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
$Na_2EDTA \cdot 2\ H_2O$ (1) (2)	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$ (1) (2)	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Estas substâncias são diferentes nos meios M4 e M7, como se indica no quadro.
(2) Estas soluções são preparadas individualmente, misturadas e colocadas de imediato numa autoclave.

Quadro 2

Soluções-mãe de macronutrientes para os meios M4 e M7

	Quantidade (mg) diluída para 1 litro com água desionizada	Quantidade de soluções-mãe de macronutrientes adicionada para preparar os meios M4 e M7 (ml/l)	Concentrações finais nas soluções de ensaio M4 e M7 (mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	293 800	1,0	293,8
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
$NaHCO_3$	64 800	1,0	64,8
$NaSiO_3 \cdot 9\ H_2O$	50 000	0,2	10,0
$NaNO_3$	2 740	0,1	0,274
KH_2PO_4	1 430	0,1	0,143
K_2HPO_4	1 840	0,1	0,184

▼**M4**

Quadro 3

Soluções-mãe de vitaminas para os meios M4 e M7

As três soluções de vitaminas são combinadas para originar uma única solução-mãe.

	Quantidade (mg) diluída para 1 litro com água desionizada	Quantidade de solução-mãe de vitaminas adicionada para preparar os meios M4 e M7 (ml/l)	Concentrações finais nas soluções de ensaio M4 e M7 (mg/l)
Cloridrato de tiamina	750	0,1	0,075
Cianocobalamina (B12)	10	0,1	0,0010
Biotina	7,5	0,1	0,00075

REFERÊNCIAS

BBA (1995). Long-term toxicity test with Chironomus riparius: Development and validation of a new test system. Editado por M. Streloke e H. Köpp. Berlim, 1995.

Elendt B.P. (1990). Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoplasma* 154: 25-33.

Elendt B.P., Bias W.-R. (1990). Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *D. magna*. *Water Research* 24 (9): 1157-1167.

▼M4

Apêndice 3

PREPARAÇÃO DOS SEDIMENTOS FORMULADOS

Composição dos sedimentos

A composição dos sedimentos formulados deve ser a seguinte:

Componente	Características	% da massa seca dos sedimentos
Turfa	Turfa de *Sphagnum*, com pH tão próximo quanto possível do intervalo 5,5-6,0, sem restos visíveis de plantas, finamente moída (granulometria ≤ 1 mm) e seca ao ar	4-5
Areia quartzítica	Granulometria: > 50 % das partículas de granulometria na gama 50-200 μm	75-76
Argila caulinítica	Teor de caulinite ≥ 30 %	20
Carbono orgânico	Ajustado por adição de turfa e areia	2 (±0,5)
Carbonato de cácio	$CaCO_3$ pulverizado quimicamente puro	0,05-0,1
Água	Condutividade ≤ 10 μS/cm	30-50

Preparação

A turfa é seca ao ar e moída até se obter um pó fino. Prepara-se uma suspensão da quantidade necessária de turfa pulverizada em água desionizada, por recurso a um dispositivo de homogeneização de alta eficiência. O pH desta suspensão é ajustado para 5,5 ± 0,5 com $CaCO_3$. A suspensão é acondicionada durante, pelo menos, dois dias, com agitação ligeira a 20 ± 2 °C, para estabilizar o pH e estabelecer um perfil microbiano estável. Findo este período, determina-se novamente o pH, que deve ser de 6,0 ± 0,5. A suspensão de turfa é então misturada com os outros componentes (areia e argila caulinítica) e água desionizada, de forma a obter sedimentos homogéneos com um teor de água da ordem de 30 %-50 % da massa seca dos sedimentos. O pH da mistura final é determinado uma vez mais e, se necessário, ajustado para 6,5-7,5 com $CaCO_3$. São colhidas amostras dos sedimentos para determinar o resíduo seco e o teor de carbono orgânico. Recomenda-se que, antes de ser utilizados num ensaio de toxicidade em quironomídeos, os sedimentos formulados sejam acondicionados durante sete dias em condições idênticas às do ensaio subsequente.

Armazenagem

Os componentes secos para a preparação dos sedimentos artificiais podem ser armazenados num local seco e fresco, à temperatura ambiente. Os sedimentos formulados (húmidos) não devem ser armazenados antes da sua utilização nos ensaios. Devem ser utilizados imediatamente após o período de acondicionamento de sete dias que conclui a sua preparação.

REFERÊNCIAS:

Capítulo C.8 deste anexo: Toxicidade em relação às minhocas.

Meller M., Egeler P., Rombke J., Schallnass H., Nagel R., Streit B. (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media. *Ecotox. and Environ. Safety* 39: 10-20.

▼**M4**

Apêndice 4

Características químicas de uma água de diluição adequada

Substância	Concentrações
Partículas	< 20 mg/l
Carbono orgânico total	< 2 mg/l
Amoníaco não ionizado	< 1 µg/l
Dureza expressa em $CaCO_3$	< 400 mg/l (*)
Cloro residual	< 10 µg/l
Pesticidas organofosforados totais	< 50 ng/l
Soma dos pesticidas organoclorados e dos bifenilos policlorados, totais	< 50 ng/l
Cloro orgânico total	< 25 ng/l

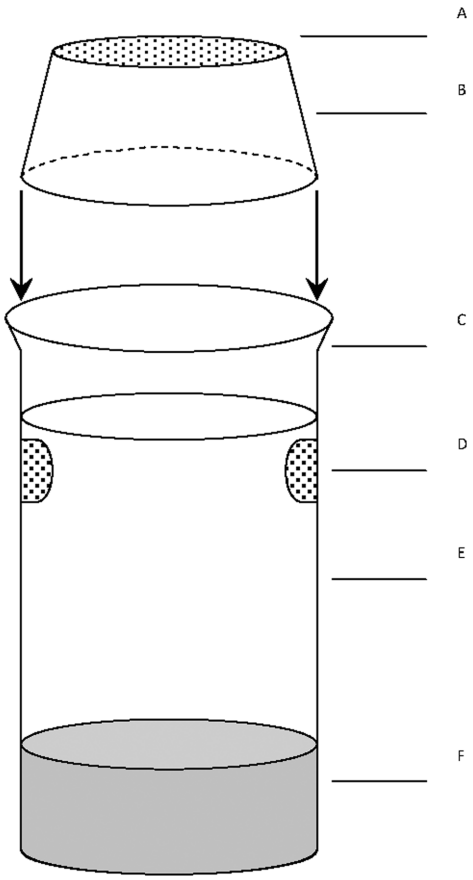
(*) Contudo, caso se suspeite da existência de uma interação entre os iões responsáveis pela dureza e a substância em estudo, deve utilizar-se uma água mais macia (nesse caso, o meio Elendt M4 não pode ser utilizado).

▼M4

Apêndice 5

Orientações para a monitorização da emergência das larvas de quironomídeos

Os copos de ensaio são munidos de armadilhas de emergência. Estas armadilhas são necessárias a partir do vigésimo dia, até ao final do ensaio. A título de exemplo, pode utilizar-se o dispositivo abaixo ilustrado:



A: tela de nylon

B: copo de plástico invertido

C: copo de exposição sem bico

D: aberturas recobertas, para renovação da água

E: água

F: sedimentos

▼M4

C.29. **BIODEGRADABILIDADE "FÁCIL" — CO_2 EM RECIPIENTES FECHADOS (Ensaio do espaço livre)**

INTRODUÇÃO

1. O presente método de ensaio é equivalente ao *Test Guideline* TG 310 da OCDE (2006). Consiste num método exploratório para a avaliação da biodegradabilidade "fácil" dos produtos químicos e proporciona informações semelhantes às dos seis métodos de ensaio descritos no capítulo C.4 do presente anexo (A a F). Assim, um produto químico com resultados positivos neste método de ensaio pode ser considerado facilmente biodegradável e, por conseguinte, rapidamente degradável no ambiente.

2. O método do dióxido de carbono (CO_2) (1), que se encontra bem implantado, baseia-se no ensaio original de Sturm (2) para a avaliação da biodegradabilidade de produtos químicos orgânicos através da medição do dióxido de carbono produzido pela ação microbiana e tem constituído, em geral, a primeira opção para o ensaio de produtos químicos pouco solúveis e de produtos químicos muito adsorventes. É também aplicado a produtos químicos solúveis (mas não voláteis), uma vez que a libertação de dióxido de carbono é frequentemente considerada a única prova inequívoca de atividade microbiana. A remoção do carbono orgânico dissolvido pode ter lugar por processos físico-químicos, como a adsorção, a volatilização, a precipitação e a hidrólise, bem como pela ação microbiana e por muitas reações não biológicas que consomem oxigénio; o CO_2 raramente é produzido a partir de produtos químicos orgânicos por via abiótica. Nos ensaios original e modificado de Sturm (1)(2), o CO_2 é removido da fase líquida para os recipientes de absorção por borbulhamento, no meio líquido, de ar tratado com o objetivo de remover o CO_2; na versão de Larson (3)(4), é transferido do recipiente de reação para os absorventes introduzindo um fluxo de ar isento de CO_2 no espaço livre acima da superfície ("*headspace*"), com agitação contínua do recipiente de ensaio. O recipiente só é agitado no caso da modificação de Larson; a agitação é prescrita, apenas para produtos químicos insolúveis, na norma ISO 9439 (5) e na versão original dos EUA (6), que preconizam ambas o borbulhamento em vez da substituição do ar no espaço livre acima da superfície. Em outro método oficial da EPA — Estados Unidos da América (7) —, que se baseia no método de Gledhill (8), o recipiente de reação, sob agitação, encontra-se estanque e o CO_2 produzido é recolhido, diretamente a partir da fase gasosa, num coletor interno com uma substância alcalina, como nos respirómetros clássicos de Warburg/Barcroft.

3. Contudo, no caso da aplicação do ensaio de Sturm modificado a vários produtos químicos (9), demonstrou-se que, durante o ensaio, se acumula no meio carbono inorgânico (CI). Na degradação de 20 mg C/l de anilina, por exemplo, observou-se uma concentração de carbono inorgânico da ordem de 8 mg/l. Assim, a recolha de CO_2 em coletores com substâncias alcalinas traduz a quantidade real daquele gás produzida microbiologicamente nas fases intermédias da degradação. Por conseguinte, a exigência de mais de 60 % da produção máxima teórica de CO_2 (CO_2Te) ser recolhida nos dez dias imediatamente após ser alcançado um nível de 10 % de biodegradação ("período de dez dias"), para que um produto químico seja classificado de facilmente biodegradável, não é cumprida no caso de alguns produtos químicos, que teriam essa classificação utilizando como critério a remoção do carbono orgânico dissolvido (COD).

4. Se a percentagem de degradação for inferior ao previsto, ter-se-á possivelmente acumulado carbono inorgânico na solução de ensaio. A biodegradabilidade pode, então, ser avaliada por recurso aos outros ensaios de biodegradabilidade "fácil".

▼M4

5. Outros inconvenientes do método de Sturm (complexidade, morosidade, propensão para a ocorrência de erros experimentais e impossibilidade de aplicação a produtos químicos voláteis) tinham já levado à procura de uma técnica com recipientes selados diversa da de Gledhill, sem fluxo de gás (10)(11). Boatman *et al.* (12) analisaram os métodos mais antigos e adotaram um sistema fechado com libertação de CO_2 no espaço livre no final da incubação, por acidificação do meio. O CO_2 foi determinado através da análise do carbono inorgânico por cromatografia em fase gasosa a partir de amostras colhidas automaticamente no espaço livre, sem ter em conta o carbono inorgânico dissolvido (CID) na fase líquida. Além disso, foram utilizados recipientes muito pequenos (20 ml), com apenas 10 ml de meio, o que causou problemas, por exemplo, ao adicionar as quantidades necessariamente muito reduzidas de produtos químicos insolúveis e/ou no caso da inexistência ou insuficiência, no meio inoculado, de microrganismos para a degradação dos produtos químicos em estudo.

6. Essas dificuldades foram superadas pelos estudos independentes de Struijs e Stoltenkamp (13) e de Birch e Fletcher (14), sendo os destes últimos inspirados pela experiência dos autores com dispositivos utilizados em ensaios de biodegradação anaeróbia (15). No método dos primeiros (13), o CO_2 é determinado no espaço livre após acidificação e equilíbrio, enquanto no segundo método (14) é determinado o carbono inorgânico dissolvido das fases gasosa e líquida, sem tratamento; mais de 90 % do carbono inorgânico formado encontra-se na fase líquida. Ambos os métodos têm vantagens relativamente ao ensaio de Sturm, na medida em que o sistema de ensaio é mais compacto e mais gerível, podem estudar-se produtos químicos voláteis e evita-se a possibilidade de demoras na determinação do CO_2 produzido.

7. Ambas as abordagens foram combinadas na norma ISO com a referência 16, que foi sujeita a um ensaio interlaboratorial (17) e constitui a base do presente método de ensaio. O método da EPA dos Estados Unidos da América (18) utiliza também as duas abordagens. Foram recomendados dois métodos de determinação do CO_2, designadamente a determinação no espaço livre após acidificação (13) e a determinação do carbono inorgânico na fase líquida após adição de um agente alcalino em excesso. Este último método foi introduzido por Peterson, no decurso do ensaio interlaboratorial da CONCAWE (19) do presente método de espaço livre modificado para determinar biodegradabilidades intrínsecas. As alterações introduzidas na revisão de 1992 dos métodos do capítulo C.4 deste anexo, relativos à determinação da biodegradabilidade "fácil" (20), foram incorporadas no presente método de ensaio, pelo que, além disso, as condições (meio, duração, etc.) são as mesmas que as do ensaio de Sturm revisto (20). Birch e Fletcher (14) referiram ter obtido com este ensaio de espaço livre resultados muito semelhantes aos obtidos, para os mesmos produtos químicos, no ensaio interlaboratorial dos métodos de ensaio revistos promovido pela OCDE (21).

PRINCÍPIO DO MÉTODO

8. O produto químico em estudo, em geral na concentração de 20 mg C/l, que constitui a única fonte de carbono e energia, é incubado num tampão de sais minerais previamente inoculado com uma população mista de microrganismos. O ensaio é realizado em recipientes selados, com ar no espaço livre acima do líquido, que proporciona uma reserva de oxigénio para a biodegradação aeróbia. A libertação de CO_2 resultante da biodegradação aeróbia total do produto químico em estudo é determinada pela medição do excesso de carbono inorgânico produzido nos recipientes de ensaio relativamente ao produzido em recipientes de ensaio em branco que contêm apenas o meio inoculado. A extensão da biodegradação é expressa em percentagem da produção máxima teórica de carbono inorgânico (CITe), com base na quantidade de produto químico em estudo, expressa em carbono orgânico, inicialmente adicionada.

9. Pode também determinar-se (20) a remoção de COD e/ou o grau de biodegradação primária do produto químico em estudo.

▼M4

INFORMAÇÕES SOBRE O PRODUTO QUÍMICO EM ESTUDO

10. Para o cálculo da percentagem de degradação, é necessário conhecer o teor de carbono orgânico (% ponderal) do produto químico em estudo, quer a partir da sua estrutura química quer por análise. No caso dos produtos químicos voláteis, o conhecimento da constante da lei de Henry, por medição ou cálculo, é útil para determinar uma razão adequada entre o espaço livre e o volume de líquido. É útil dispor de informações sobre a toxicidade do produto químico em estudo para os microrganismos, a fim de selecionar as concentrações de ensaio adequadas e para interpretar resultados de baixa biodegradabilidade: recomenda-se a realização de controlos de inibição, exceto se se souber que o produto químico não inibe a atividade microbiana (ver o ponto 24).

APLICABILIDADE DO MÉTODO

11. O ensaio é aplicável a produtos químicos solúveis e insolúveis em água, embora deva assegurar-se uma boa dispersão do produto químico. Utilizando a proporção recomendada de 1:2 entre o espaço livre e o volume de líquido, podem utilizar-se produtos químicos voláteis com uma constante da lei de Henry não superior a 50 $Pa.m^3.mol^{-1}$, dado que a percentagem do produto químico no espaço livre não excederá 1 % (13). Pode utilizar-se um volume menor de espaço livre no ensaio de produtos químicos mais voláteis, cuja biodisponibilidade possa ser um fator limitante, em especial se forem pouco solúveis em água. No entanto, os utilizadores devem assegurar que a razão entre o espaço livre e o volume de líquido, bem como a concentração do produto químico, proporcionam uma quantidade suficiente de oxigénio para permitir a biodegradação aeróbia completa, evitando, por exemplo, o recurso a uma concentração elevada de substrato e a um espaço livre reduzido. As referências (13) e (23) contêm orientações nesta matéria.

PRODUTOS QUÍMICOS DE REFERÊNCIA

12. A fim de verificar o procedimento, deve submeter-se a ensaio, em paralelo, uma substância de referência de biodegradabilidade conhecida. Para o efeito, a anilina, o benzoato de sódio e o etilenoglicol podem ser utilizados com produtos químicos solúveis em água, podendo utilizar-se o 1-octanol no caso de produtos químicos pouco solúveis (13). A biodegradação destes produtos químicos deve ser superior a 60 % do carbono inorgânico teórico, em 14 dias.

REPRODUTIBILIDADE

13. No ensaio interlaboratorial do método, promovido pela ISO (17), foram obtidos os seguintes resultados utilizando as condições recomendadas, nomeadamente uma concentração do produto químico em estudo de 20 mg C/l.

Produto químico	Percentagem média de biodegradação (28 dias)	Coeficiente de variação (%)	Número de laboratórios
Anilina	90	16	17
1-Octanol	85	12	14

Com anilina, a variabilidade interna dos ensaios (indicador de replicabilidade) foi reduzida, não excedendo os coeficientes de variabilidade 5 % em quase todas as séries de ensaios. Nos dois casos em que a replicabilidade foi pior, a variabilidade mais elevada deveu-se provavelmente à elevada produção de carbono inorgânico nos ensaios em branco. Com 1-octanol, registou-se uma replicabilidade mais baixa, embora com variabilidade inferior a 10 % em 79 % das séries de ensaios. Esta maior variabilidade interna dos ensaios pode ter sido devida a erros de dosagem, dado que foi necessário injetar um pequeno volume (3 a 4 µl) de 1-octanol nos recipientes de ensaio selados. Obtém-se coeficientes de variação superiores quando se utilizam concentrações mais baixas do produto químico em estudo, nomeadamente inferiores a 10 mg C/l. Este problema pode ser parcialmente superado reduzindo a concentração de carbono inorgânico total (CIT) no inóculo.

▼M4

14. Num ensaio interlaboratorial promovido pela UE (24) de cinco produtos químicos tensioativos adicionadas na concentração de 10 mg C/l, foram obtidos os seguintes resultados:

Produto químico	Percentagem média de biodegradação (28 dias)	Coeficiente de variação (%)	Número de laboratórios
Benzenossulfonato de tetrapropileno	17	45	10
Di-iso-octilssulfosuccinato (aniónico)	72	22	9
Cloreto de hexadeciltrimetil-amónio (*) (catiónico)	75	13	10
$(Etoxilato)_9$ de isononilfenol (não iónico)	41	32	10
Amidopropil de coco-dimetil-hidroxissulfobetaína (anfotérico)	60	23	11

(*) Adicionou-se SiO_2 para neutralizar a toxicidade.

Os resultados mostram que, de um modo geral, a variabilidade foi superior no caso dos tensioativos menos degradados. A variabilidade interna dos ensaios foi inferior a 15 % em mais de 90 % dos casos; o maior valor registado foi da ordem de 30 % a 40 %.

NOTA: Na sua maioria, os tensioativos não são espécies moleculares simples, mas misturas de isómeros, homólogos, etc., com tempos de degradação característicos diferentes e constantes cinéticas diferentes, que produzem curvas mal definidas e atenuadas. Poderá, portanto, não ser possível atingir o limiar de 60 % no período de 10 dias, embora cada espécie molecular ultrapasse esse valor em 10 dias se for ensaiada isoladamente. Este facto também pode ser observado com outras misturas complexas.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Equipamento

15. Material corrente de laboratório, nomeadamente:

a) frascos de soro de vidro, selados com rolhas de borracha butílica e cápsulas de alumínio. A capacidade recomendada é "125 ml", a que corresponde um volume total de cerca de 160 ml (neste caso, o volume de cada frasco deve ser comprovadamente de 160 ± 1 ml). Se os resultados satisfizerem as condições descritas nos pontos 66 e 67, pode utilizar-se recipientes de capacidade inferior;

b) analisador de carbono ou outro instrumento (p. ex. cromatógrafo de gás) para a determinação do carbono inorgânico;

▼M4

c) seringas de elevada precisão para amostras gasosas e líquidas;

d) agitador orbital num ambiente com controlo de temperatura;

e) fonte de ar isento de CO_2 — este ar pode ser preparado fazendo passar uma corrente de ar por grânulos de cal sodada ou utilizando uma mistura gasosa com 80 % N_2/20 % 0_2 (opcional) (ver o ponto 28);

f) dispositivo de filtração com membrana de porosidade 0,20-0,45 μm (opcional);

g) analisador de carbono orgânico (opcional).

Reagentes

16. Utilizar reagentes de qualidade analítica em todo o processo.

Água

17. Deve utilizar-se água destilada ou desionizada com teor de carbono orgânico total não superior a 1 mg/l. Este valor não excede 5 % do teor de carbono orgânico inicial introduzido pela dose recomendada do produto químico em estudo.

Soluções-mãe para o meio de sais minerais

18. As soluções-mãe e o meio de sais minerais são semelhantes aos utilizados nos ensaios ISO 14593 (16) e C.4 ("Biodegradabilidade 'fácil'") (20). A utilização de uma concentração mais elevada de cloreto de amónio (2,0 g/l em vez de 0,5 g/l) só é necessária em casos muito excecionais, por exemplo, se a concentração do produto químico em estudo exceder 40 mg de C/l. As soluções-mãe devem ser armazenadas com refrigeração e eliminadas após seis meses (ou antes, se existirem indícios de precipitação ou de crescimento microbiano). Preparar as seguintes soluções-mãe:

a) di-hidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4) 8,50g

hidrogenofosfato de dipotássio (K_2HPO_4) 21,75g

hidrogenofosfato de dissódio di-hidratado ($Na_2HPO_4.2H_2O$) 33,40g

cloreto de amónio (NH_4Cl) 0,50g

Dissolver em água e ajustar para 1 litro. O pH desta solução deve ser de 7,4 (± 0,2). Se tal não for o caso, preparar uma solução nova;

b) cloreto de cálcio di-hidratado ($CaCl_2.2H_2O$) 36,40g

Dissolver em água e ajustar para 1 litro;

c) sulfato de magnésio hepta-hidratado ($MgSO_4.7H_2O$) 22,50g

Dissolver em água e ajustar para 1 litro;

d) cloreto de ferro (III) hexa-hidratado ($FeCl_3.6H_20$) 0,25g

Dissolver em água e ajustar para 1 litro, adicionando de seguida uma gota de ácido concentrado.

Preparação do meio de sais minerais

19. Dissolver 10 ml de solução (a) em cerca de 800 ml de água (ponto 17), adicionando de seguida 1 ml das soluções (b), (c) e (d), e ajustar o volume para 1 litro com água (ponto 17).

Outros reagentes

20. Ácido ortofosfórico (H_3PO_4) concentrado (> 85 %, em massa por volume).

▼M4

Solução de hidróxido de sódio 7 M

21. Dissolver 280 g de hidróxido de sódio (NaOH) em 1 litro de água (ponto 17). Determinar a concentração de carbono inorgânico dissolvido da solução e ter em conta este valor no cálculo do resultado do ensaio (ver os pontos 55 e 61), nomeadamente à luz do critério de validade que consta do ponto 66, alínea b). Se a concentração de carbono inorgânico dissolvido for demasiado elevada, preparar uma solução nova.

Produto químico em estudo

22. Preparar uma solução-mãe de um produto químico suficientemente hidrossolúvel, em água (ponto 17) ou no meio de ensaio (ponto 19), a uma concentração de preferência 100 vezes superior à concentração final a utilizar no ensaio; pode ser necessário ajustar o pH da solução-mãe. Esta solução deve ser adicionada ao meio mineral, de modo a obter uma concentração final de carbono orgânico compreendida entre 2 e 40 mg C/l (de preferência 20 mg C/l). A utilização de concentrações inferiores a estas pode comprometer a precisão dos resultados. Os produtos químicos líquidos solúveis e insolúveis podem ser diretamente introduzidos nos recipientes por meio de seringas de alta precisão. Os produtos químicos pouco solúveis e insolúveis podem exigir um tratamento especial (25). As opções nesta matéria são as seguintes:

a) adição direta de quantidades pesadas conhecidas;

b) dispersão por meio de ultrassons antes da adição;

c) dispersão com o auxílio de agentes emulsionantes, sendo necessário determinar antes da adição se os mesmos têm efeitos inibidores ou estimulantes da atividade microbiana;

d) adsorção do produto químico líquido, ou de uma solução num solvente volátil adequado, num meio ou suporte inerte (por exemplo, filtro de fibra de vidro), seguida de evaporação do solvente, se utilizado, e adição direta de quantidades conhecidas;

e) colocação no recipiente de ensaio vazio de um volume conhecido de uma solução do produto químico em estudo num solvente muito volátil, seguida de evaporação do solvente.

É necessário verificar se os agentes ou solventes utilizados nas alíneas c), d) e e) têm efeitos estimulantes ou inibidores da atividade microbiana — ver o ponto 42, alínea b).

Produto químico de referência

23. Preparar uma solução-mãe do produto químico (solúvel) de referência em água (ponto 17), com uma concentração, de preferência, 100 vezes superior à concentração final a utilizar no ensaio (20 mg C/l).

Verificação da inibição

24. Frequentemente, os produtos químicos estudados não sofrem degradação significativa nas condições utilizadas nas avaliações de biodegradabilidade "fácil". Uma das causas possíveis deste facto reside no efeito inibidor, para o inóculo, do produto químico em estudo, às concentrações em que é utilizado no ensaio. A verificação da inibição pode ser incluída no procedimento de ensaio, para facilitar a identificação (*a posteriori*) da inibição como causa possível ou fator contribuinte. A verificação da inibição também permite excluir essas interferências e demonstrar que a ausência de degradação ou a ocorrência de uma degradação ligeira é apenas atribuível a condições de ensaio pouco propícias à ação microbiana. A fim de obter informações sobre a toxicidade do produto químico em estudo para microrganismos (aeróbios), preparar uma solução, no meio de ensaio, do produto químico em estudo e do produto químico de referência (ponto 19), cada um nas concentrações utilizadas no ensaio (ver os pontos 22 e 23).

▼M4

Inóculo

25. O inóculo pode ter várias origens: lamas ativadas, efluentes de águas residuais (não clorados), águas de superfície e solos ou uma mistura destes (20). A atividade de biodegradação da fonte do inóculo deve ser verificada por recurso a um produto químico de referência. Independentemente da fonte, não devem ser utilizados microrganismos anteriormente expostos ao produto químico em estudo para ensaios de determinação da biodegradabilidade "fácil".

Atenção: As lamas ativadas, e as águas residuais ou os efluentes de águas residuais, contêm organismos patogénicos, pelo quem devem ser manipulados com cuidado.

26. De acordo com a experiência adquirida, o volume ótimo de inóculo satisfaz as seguintes condições:

— é suficiente para proporcionar uma atividade de biodegradação adequada,

— degrada o produto químico de referência na percentagem estabelecida (ver o ponto 66),

— origina 10^2 a 10^5 unidades formadoras de colónias por mililitro, na mistura final,

— origina, em geral, uma concentração de 4 mg/l de sólidos em suspensão na mistura final quando se utilizam lamas ativadas; é possível utilizar concentrações até 30 mg/l, que podem, contudo, aumentar significativamente a produção de CO_2 nos ensaios em branco (26),

— representa menos de 10 % da concentração inicial de carbono orgânico introduzida pelo produto químico em estudo,

— é, geralmente, da ordem de 1-10 ml por litro de solução de ensaio.

Lamas ativadas

27. As lamas ativadas são recolhidas do frasco no tanque de arejamento de uma estação de tratamento de águas residuais, ou unidade à escala laboratorial, que trate essencialmente esgotos domésticos. Se necessário, as partículas grosseiras devem ser removidas por crivagem (p. ex., através de um crivo de malha de 1 mm^2); as lamas devem ser mantidas em condições aeróbias até à sua utilização.

28. Em alternativa, após a remoção das partículas grosseiras eventualmente presentes, deixar sedimentar ou centrifugar (por exemplo, a 1 100 g durante 10 minutos). Remover o líquido sobrenadante. As lamas podem ser lavadas na solução de sais minerais. Preparar uma suspensão das lamas concentradas no meio de sais minerais, de forma a obter uma concentração de 3-5 g de sólidos em suspensão/l. Proceder de seguida ao arejamento enquanto for necessário.

29. As lamas devem ser obtidas numa estação de tratamento convencional em bom estado de funcionamento. Se forem obtidas numa estação de tratamento de débito elevado ou se nelas se admitir a presença de inibidores, devem ser lavadas. Após obter uma mistura homogénea, deixar sedimentar ou centrifugar as lamas repostas em suspensão, rejeitar o sobrenadante e preparar nova suspensão das lamas lavadas num novo volume de meio de sais minerais. Repetir este procedimento até que as lamas possam considerar-se isentas de substrato em excesso ou de inibidor.

30. Quando a nova suspensão estiver preparada, ou no caso de se utilizarem lamas não tratadas, colher uma amostra imediatamente antes da utilização, para determinar a massa seca dos sólidos em suspensão.

31. A homogeneização das lamas ativadas (3-5 g de sólidos em suspensão/l) constitui uma alternativa. Tratar as lamas num misturador de Waring durante dois minutos, a velocidade média. Deixar sedimentar a mistura de lamas durante 30 minutos ou, se necessário, por um período mais longo, e decantar o líquido, para utilização das lamas como inóculo na proporção de 10 mg/l de meio de sais minerais.

▼M4

32. É possível obter uma redução ainda maior do CO_2 libertado no ensaio em branco através do arejamento das lamas durante a noite com ar isento de CO_2. Utilizar como inóculo no presente ensaio 4 mg de sólidos das lamas ativadas por litro (13).

Efluente secundário de águas residuais

33. Em alternativa, o inóculo pode ser colhido num efluente secundário de uma estação de tratamento, ou unidade à escala laboratorial, que trate essencialmente esgotos domésticos. Manter a amostra em condições aeróbias e utilizar no dia da colheita, ou efetuar um pré-acondicionamento, se necessário. Deve utilizar-se um filtro para remover as partículas grosseiras do efluente, determinando-se também o pH.

34. Para reduzir o teor de carbono inorgânico do filtrado, borbulha-se neste ar isento de CO_2 — ponto 15, alínea e) — durante 1 h, mantendo o pH a 6,5 com o auxílio de ácido ortofosfórico (ponto 20). O pH inicial é reposto com o auxílio de uma solução de hidróxido de sódio (ponto 21); após sedimentação durante cerca de 1 h, toma-se uma alíquota do sobrenadante para inoculação. Este procedimento permite reduzir o teor de carbono inorgânico do inóculo. Por exemplo, quando se utiliza como inóculo o volume máximo recomendado de efluente filtrado borbulhado (100 ml) por litro, a quantidade de carbono inorgânico presente nos recipientes de ensaio em branco é da ordem de 0,4 a 1,3 mg/l (14), o que representa 2 % a 6,5 % do carbono do produto químico em estudo, relativamente a uma concentração de 20 mg C/l, e 4 % a 13 %, relativamente a uma concentração de 10 mg C/l.

Águas de superfície

35. Colher uma amostra de uma água de superfície adequada. A amostra deve ser mantida em condições aeróbias e ser utilizada no dia da colheita. Se necessário, deve ser concentrada por filtração ou centrifugação. O volume de inóculo a utilizar em cada recipiente de ensaio deve satisfazer as condições enunciadas no ponto 26.

Solos

36. Colhe-se uma amostra de um solo adequado, a uma profundidade não superior a 20 cm. Deve remover-se da amostra pedras, restos vegetais e invertebrados, após o que a amostra é peneirada através de uma malha de 2 mm (se a amostra estiver demasiado húmida para ser peneirada de imediato, secá-la parcialmente ao ar para facilitar a operação). A amostra deve ser mantida em condições aeróbias e ser utilizada no dia da colheita (se for transportada num saco de polietileno negro não hermético, pode ser armazenada nesse saco, a uma temperatura de 2 a 4 °C, pelo período máximo de um mês).

Pré-acondicionamento do inóculo

37. Os inóculos podem ser pré-acondicionados para as condições experimentais, mas não podem ser pré-adaptados ao produto químico em estudo. O pré-acondicionamento pode reduzir a libertação de CO_2 nos recipientes de ensaio em branco. A operação consiste em arejar as lamas ativadas, durante cinco a sete dias, com ar húmido isento de CO_2, à temperatura de ensaio, após diluição para 30 mg/l no meio de ensaio.

PROCEDIMENTO

Número de frascos

38. O número de frascos — ponto 15, alínea a) — necessários depende da frequência das análises e da duração do ensaio.

39. Recomenda-se a análise de frascos em triplicado após um número suficiente de períodos, de modo a permitir a identificação do período de 10 dias. Devem também analisar-se, pelo menos, cinco frascos — ponto 15, alínea a) — das séries a), b) e c) (ver o ponto 42), no final do ensaio, para permitir o cálculo de intervalos de confiança de 95 % para a percentagem média de biodegradação.

▼M4

Meio inoculado

40. O inóculo é utilizado numa concentração de 4 mg de sólidos secos de lamas ativadas por litro. Preparar, imediatamente antes da utilização, uma quantidade suficiente de meio inoculado, por exemplo, adicionando 2 ml de lamas ativadas sujeitas a um tratamento adequado (pontos 27 a 32), à concentração de 2 000 mg/l, a 1 litro de meio de sais minerais (ponto 19). Se forem utilizados efluentes secundários de águas residuais, adicionar 100 ml de efluente (ponto 33) a 900 ml de meio de sais minerais (ponto 19) e diluir para 1 litro com o meio.

Preparação dos frascos

41. Coloca-se alíquotas de meio inoculado em séries de frascos replicados, de forma a obter uma proporção espaço livre/líquido de 1:2 (colocar, por exemplo, 107 ml em frascos de 160 ml de capacidade). Pode utilizar-se outras proporções, atendendo, contudo, às recomendações que constam do ponto 11. Qualquer que seja o tipo de inóculo utilizado, deve assegurar-se que o meio inoculado está devidamente homogeneizado, tendo em vista a sua distribuição uniforme nos frascos de ensaio.

42. Prepara-se as seguintes séries de frascos – ponto 15, alínea a):

a) recipientes de ensaio (assinalados por F_T), que contêm o produto químico em estudo;

b) recipientes de ensaio em branco (assinalados por F_B) que contêm apenas o meio de ensaio e o inóculo; devem adicionar-se também quaisquer produtos químicos, solventes, agentes ou filtros de fibra de vidro utilizados para a introdução do produto químico em estudo nos recipientes de ensaio;

c) recipientes para controlo do processo (assinalados por F_C), que contêm o produto químico de referência;

d) se necessário, recipientes destinados à verificação do possível efeito inibidor do produto químico em estudo (assinalados por F_I), que contêm este e o produto químico de referência nas mesmas concentrações que, respetivamente, os frascos F_T e F_C (ponto 24);

e) recipientes (assinalados por F_S) destinados à verificação da possível degradação abiótica, preparados como descrito na alínea a), mas contendo, além disso, 50 mg/l de $HgCl_2$ ou esterilizados por outros meios (por exemplo, tratamento em autoclave).

43. Os produtos químicos em estudo e de referência hidrossolúveis são adicionados na forma de soluções-mãe aquosas (pontos 22, 23 e 24), de modo a obter uma concentração de 10 a 20 mg C/l.

44. Os produtos químicos em estudo e de referência insolúveis em água são introduzidos nos frascos de diversas formas — ver o ponto 22, alíneas a)-e) —, consoante a sua natureza, antes ou depois da adição do meio inoculado, em função do método de tratamento do produto químico em estudo. Se for utilizado um dos métodos indicados no ponto 22, alíneas a) a e), os frascos F_B — ponto 42, alínea b) — devem ser tratados de forma idêntica, mas sem o produto químico em estudo e o produto químico de referência.

45. Os produtos químicos em estudo voláteis devem ser injetados nos frascos selados (ponto 47) com o auxílio de uma microsseringa. A dose é calculada com base no volume injetado e na densidade do produto.

46. Quando necessário, deve acrescentar-se água aos recipientes, de forma que o volume de líquido seja idêntico em todos eles. Deve garantir-se que a razão entre o espaço livre e o volume de líquido (geralmente 1:2), bem como a concentração do produto químico em estudo, sejam tais que a quantidade de oxigénio presente no espaço livre seja suficiente para permitir a biodegradação completa.

▼M4

47. Seguidamente, todas as garrafas são seladas, por exemplo, com rolhas de borracha butílica e cápsulas de alumínio. Os produtos químicos em estudo voláteis devem ser introduzidos nesta fase (ponto 45). Caso se pretenda monitorizar o decréscimo da concentração de COD da solução de ensaio e efetuar análises da concentração inicial de carbono inorgânico — controlos "estéreis"; ponto 42, alínea e) — ou outras determinações, colher uma amostra adequada do recipiente de ensaio. O recipiente de ensaio e o seu conteúdo são, em seguida, eliminados.

48. Os frascos selados são colocados num agitador rotativo — ponto 15, alínea d) —, com uma agitação suficiente para manter o conteúdo homogeneizado e em suspensão (por exemplo, 150 a 200 rpm), e incubados, no escuro, à temperatura de 20 °C ± 1 °C.

Amostragem

49. O padrão de amostragem depende do período de latência e da taxa cinética de biodegradação do produto químico em estudo. Retiram-se frascos para análise no dia da colheita de amostras, que deve ocorrer, pelo menos, uma vez por semana, ou, caso se pretenda obter uma curva de degradação completa, com uma frequência superior (por exemplo, duas vezes por semana). Retira-se do agitador o número necessário de frascos replicados, designadamente F_T, F_B e F_C e, se for caso disso, F_I e F_S (ver o ponto 42). O ensaio prolonga-se, geralmente, por 28 dias. Se a curva de biodegradação exibir um patamar antes do 28.º dia, o ensaio pode ser concluído. Colher, para análise, amostras dos cinco frascos reservados para o 28.º dia e utilizar os resultados para calcular os limites de confiança ou o coeficiente de variação da percentagem de biodegradação. Os frascos respeitantes ao controlo da inibição e da degradação abiótica não necessitam de amostragem tão frequente quanto os restantes frascos; basta colher amostras no 1.º e no 28.º dia.

Análise do carbono inorgânico

50. A produção de CO_2 nos frascos é determinada através da medição do aumento da concentração de carbono inorgânico (CI) durante a incubação. Recomendam-se dois métodos para a medição da quantidade de carbono inorgânico produzida no ensaio, que se descrevem a seguir. Dado que os métodos podem conduzir a resultados ligeiramente diferentes, deve ser utilizado apenas um deles por série de ensaios.

51. O método a) é recomendado se for provável que o meio contenha resíduos, nomeadamente, de filtros de fibra de vidro e/ou de produtos químicos em estudo insolúveis. Caso não se disponha de um analisador de carbono, esta análise poderá ser realizada por recurso a um cromatógrafo em fase gasosa. É importante que os frascos se encontrem à temperatura de ensaio, ou a uma temperatura próxima desta, quando se procede à análise do gás presente no espaço livre. O método b) pode ser de utilização mais fácil para os laboratórios que utilizam analisadores de carbono para determinar o carbono inorgânico. É importante que a solução de hidróxido de sódio (ponto 21) utilizada para converter o CO_2 em carbonato seja preparada na altura ou que o seu teor de carbono inorgânico seja conhecido, a fim de que este parâmetro possa ser tido em conta no cálculo dos resultados dos ensaios — ver o ponto 66, alínea b).

Método a): acidificação a pH < 3

52. Antes de efetuar cada série de análises, o analisador de carbono inorgânico é calibrado utilizando uma substância com um teor-padrão de carbono inorgânico — por exemplo, mistura a 1 % (m/m) de CO_2 em N_2. Injeta-se ácido ortofosfórico concentrado (ponto 20) através do septo de cada frasco de amostra, de forma a reduzir o pH do meio para menos de 3 (adicionar, por exemplo, 1 ml a 107 ml de meio de ensaio). Os frascos são então recolocados no agitador. Após agitação durante uma hora à temperatura de ensaio, os frascos são removidos do agitador, colhendo-se alíquotas (por exemplo, 1 ml) de gás no espaço livre de cada frasco, que se injetam no analisador de carbono inorgânico. As concentrações de carbono inorgânico são registadas em mg C/l.

▼M4

53. O princípio deste método reside em que, após acidificação a pH < 3 e equilíbrio a 20 °C, a constante de partição do CO_2 entre as fases gasosa e líquida nos frascos de ensaio, determinada em termos de concentração, ser de 1,0 (13). Este facto deve ser comprovado, para o sistema de ensaio, pelo menos uma vez, do seguinte modo:

Preparar frascos com teores de carbono inorgânico de 5 e 10 mg/l, por recurso a uma solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3) anidro em água isenta de CO_2, preparada por acidificação de água a pH 6,5 com ácido ortofosfórico concentrado (ponto 20), na qual se fez borbulhar, de um dia para o outro, ar isento de CO_2, e se neutralizou depois o pH com álcalis. Assegurar que a proporção entre o espaço livre e o volume de líquido é a mesma que nos ensaios (por exemplo, 1:2). Acidificar e deixar estabilizar do modo descrito no ponto 52, determinando de seguida as concentrações de carbono inorgânico no espaço livre e na fase líquida. Verificar se as concentrações são iguais, dentro dos limites do erro experimental. Se não forem, o operador deve reexaminar os procedimentos. Não é necessário verificar em cada ensaio a partição do carbono inorgânico entre as fases gasosa e líquida. A verificação pode, em geral, ser efetuada aquando da calibração.

54. Caso se pretenda determinar a remoção do COD (apenas no caso de produtos químicos solúveis em água), devem colher-se amostras da fase líquida de frascos distintos (não acidificados), que são filtradas por uma membrana e injetadas no analisador de COD. Estes frascos podem ser utilizados para outras análises, consoante necessário, com o objetivo de determinar a biodegradação primária.

Método b): conversão de CO_2 a carbonato

55. Antes de cada série de análises, o analisador de carbono inorgânico é calibrado com um padrão adequado — por exemplo, uma solução de bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$) em água isenta de CO_2 (ver o ponto 53), na gama de concentrações de carbono inorgânico de 0 a 20 mg/l. Injeta-se através do septo de cada frasco no qual se colhe uma amostra uma solução de hidróxido de sódio 7 M (ponto 21) — por exemplo, 1 ml em 107 ml de meio —, sendo esses frascos agitados durante 1 h à temperatura de ensaio. Utilizar a mesma solução de NaOH em todos os frascos retirados num determinado dia, mas não obrigatoriamente em todas as colheitas destas amostras ao longo do ensaio. Se forem necessários valores absolutos de concentrações de carbono inorgânico das amostras em branco quando de todas as colheitas de amostras, é necessário determinar o teor de carbono inorgânico da solução de NaOH em cada utilização. Remover os frascos em causa do agitador e colocá-los em repouso. Retirar com uma seringa volumes adequados (por exemplo, 50 a 1 000 µl) da fase líquida de cada frasco. Injetar as amostras no analisador de carbono inorgânico, registando as concentrações deste obtidas. Deve assegurar-se que o aparelho é adequado às amostras alcalinas produzidas no presente método.

56. O princípio do método reside em que, após a adição de solução alcalina e a agitação, o teor de carbono inorgânico no espaço livre é insignificante. Este facto deve ser comprovado para cada sistema de ensaio pelo menos uma vez, por recurso a padrões de carbono inorgânico, mediante a adição de uma solução alcalina, estabilização e a determinação da concentração de carbono inorgânico no espaço livre e nas fases líquidas (ver o ponto 53). A concentração no espaço livre deve ser praticamente nula. Não é necessário verificar a absorção quase completa do CO_2 em cada ensaio.

57. Caso se pretenda determinar a remoção do COD (apenas no caso de produtos químicos solúveis em água), devem colher-se amostras da fase líquida de frascos distintos sem solução alcalina adicionada, que são filtradas por uma membrana e injetadas no analisador de COD. Estes frascos podem ser utilizados para outras análises, consoante necessário, com o objetivo de determinar a biodegradabilidade primária.

▼M4

DADOS E RELATÓRIOS

Cálculo dos resultados

58. Pressupondo que a mineralização do produto químico em estudo em CO_2 é de 100 %, o teor de carbono inorgânico teórico (CITe) superior ao produzido nos frascos de ensaio em branco é igual ao COT adicionado a cada frasco no início dos ensaios, isto é:

$$CITe = COT.$$

A massa total (mg) de carbono inorgânico (CIT) em cada frasco é:

$$\begin{aligned} CIT &= (\text{mg C na fase líquida} + \text{mg C no espaço livre}) \\ &= (V_L \times C_L) + (V_H \times C_H) \end{aligned} \qquad \text{Equação 1}$$

em que:

V_L = volume de líquido no frasco (litros);

C_L = concentração de carbono inorgânico no líquido (mg/l, expressa em carbono);

V_H = volume do espaço livre (litros);

C_H = concentração de carbono inorgânico no espaço livre (mg/l, expressa em carbono).

O cálculo do CIT em ambos os métodos de análise utilizados para a determinação do carbono inorgânico no presente ensaio é descrito nos pontos 60 e 61. A percentagem de biodegradação (*% D*), em ambos os casos, é dada por:

$$\%D = \frac{(TIC_t - TIC_b)}{TOC} \times 100 \qquad \text{Equação 2}$$

em que:

CIT_t = mg de CIT no frasco de ensaio, no instante *t*;

CIT_b = mg de CIT (em média) nos frascos de ensaio em branco, no instante *t*;

COT = mg de COT almente no recipiente de ensaio.

A percentagem de biodegradação (% D) é calculada para os frascos de ensaio (F_T), de referência (F_C) e, caso tenham sido incluídos, de controlo da inibição (F_I), com base nas quantidades respetivas de CIT produzidas até ao instante da colheita de cada amostra.

59. Caso se observe um aumento significativo do teor de CIT nos frascos de controlo estéreis (F_S) no período de ensaio, pode concluir-se ter ocorrido degradação abiótica do produto químico em estudo, devendo este facto ser tido em conta no cálculo do parâmetro D na equação 2.

Acidificação para pH < 3

60. Uma vez que a acidificação para pH < 3 e o posterior equilíbrio resultam na uniformização da concentração de carbono inorgânico total nas fases gasosa e líquida, apenas é necessário determinar a concentração de carbono inorgânico na fase gasosa. Aplica-se a equação $1CIT = (V_L + V_H) \times C_H = V_B \times C_H$, em que V_B é o volume do frasco de soro.

Conversão do CO_2 em carbonato

61. No presente método, os cálculos são realizados como na equação 1, sem ter em conta a quantidade insignificante de carbono inorgânico na fase gasosa, ou seja, $V_H \times C_H = 0$ $eCIT = V_L \times C_L$.

▼M4

Expressão dos resultados

62. A curva de biodegradação é obtida através da representação gráfica da percentagem de biodegradação (D) em função do tempo de incubação, indicando-se, se possível, a fase de latência, a fase de degradação, o período de 10 dias e a fase de patamar, que é a fase na qual já se atingiu a degradação máxima e a curva de biodegradação estabilizou. Se forem obtidos resultados comparáveis (diferença inferior a 20 %) para os recipientes de ensaio em paralelo, F_T, representa-se graficamente uma curva média (ver o apêndice 2, figura 1); se tal não for o caso, representam-se as curvas relativas a cada recipiente. Determina-se o valor médio da percentagem de biodegradação na fase de patamar ou identifica-se o valor mais elevado da mesma (por exemplo, quando a curva começa a infletir, na fase de patamar), mas, neste último caso, é importante verificar se o valor em causa não é anómalo. No relatório dos ensaios, este nível máximo de biodegradação deve ser expresso como "grau de biodegradação do produto químico em estudo". Se o número de recipientes de ensaio se tiver revelado insuficiente para definir uma fase de patamar, utilizam-se os dados determinados no último dia do ensaio para calcular um valor médio. Este valor (média de cinco replicados), serve de indicador da precisão de determinação da percentagem de biodegradação. Indicar também o valor obtido no final do período de 10 dias.

63. Representar, do mesmo modo, a curva correspondente ao produto químico de referência (F_C), bem como, se for caso disso, a curva relativa ao controlo da eliminação abiótica (F_S) e a curva relativa ao controlo da inibição (F_I).

64. Registar os teores de carbono inorgânico total presentes nos ensaios em branco (F_B), bem como, se for caso disso, os teores de CIT presentes nos frascos F_S (controlo da eliminação abiótica).

65. Calcular a degradação (D) para os recipientes F_I a partir do rendimento teórico de carbono inorgânico previsto apenas com base no componente de referência da mistura. Se, no dia 28, $[(D_{FC}\ (^1) - D_{FI}\ (^2))/D_{FC}] \times 100 > 25$ %, pode presumir-se que o produto químico em estudo inibe a atividade do inóculo, facto que permite justificar os valores reduzidos de D_{FT} obtidos nas condições de ensaio. Neste caso, pode repetir-se o ensaio com uma concentração mais baixa, reduzindo, de preferência, o CID no inóculo e o CIT formado nos ensaios em branco, dado que, se assim não for, a redução da concentração reduzirá a precisão do método. Em alternativa, pode utilizar-se outro inóculo. Se, no frasco F_S (controlo da eliminação abiótica), se observar um aumento significativo (> 10 %) da quantidade de CIT, é possível que tenham ocorrido processos de degradação abiótica.

Validade dos resultados

▼M7

66. Um ensaio é considerado válido se:

a) a percentagem média de degradação nos recipientes F_C que contêm o produto químico de referência (FC) for superior a 60 % até ao 14.º dia de incubação; e

b) a quantidade média de CIT presente nos ensaios em branco (F_B) no final do ensaio for inferior a 3 mg C/l.

Se estes valores-limite não forem satisfeitos, repetir o ensaio com um inóculo proveniente de outra fonte e/ou rever os procedimentos utilizados. Por exemplo, se se registar uma elevada produção de carbono inorgânico no ensaio em branco, deve seguir-se o procedimento indicado nos pontos 27 a 32.

(1) Percentagem de degradação nos recipientes F_C, que contêm a substância de referência.
(2) Percentagem de degradação nos recipientes F_I.

▼M4

67. Se o produto químico em estudo não gerar 60 % do teor de carbono inorgânico teórico e tiver sido demonstrado que não tem efeitos inibidores (ponto 65), pode repetir-se o ensaio com uma concentração mais elevada de inóculo (até 30 mg de lamas ativadas por litro e 100 ml de efluente por litro) ou com inóculos provenientes de outras fontes, nomeadamente nos casos em que a degradação se tenha situado na gama de 20 a 60 %.

Interpretação dos resultados

68. A obtenção de uma biodegradação superior a 60 % do carbono inorgânico teórico no período de 10 dias do presente ensaio demonstra que o produto químico em estudo é facilmente biodegradável em condições aeróbias.

69. Se o referido valor de 60 % não for atingido, determinar o pH no meio presente nos frascos que não tenham sido acidificados nem alcalinizados; um valor inferior a 6,5 pode indicar a ocorrência de nitrificação. Nesse caso, repetir o ensaio com uma solução-tampão de concentração mais elevada.

Relatório dos ensaios

70. Elaborar um quadro com a percentagem de degradação para cada frasco de ensaio (F_T), de referência (F_C) e, se for caso disso, de controlo da inibição (F_I), para cada dia de colheita de amostras. Se forem obtidos resultados comparáveis para os frascos replicados, traçar a curva da percentagem média de degradação (% D) em função do tempo. Registar o CIT nos frascos correspondentes aos ensaios em branco (F_B) e aos controlos estéreis (F_S), bem como o COD e/ou outros parâmetros, além da percentagem de remoção.

71. Determinar o valor médio da percentagem de degradação na fase de patamar, ou utilizar o valor mais elevado, se a curva de biodegradação começar a infletir na fase de patamar, e apresentar um deles como "grau de biodegradação do produto químico em estudo". Neste último caso, importa garantir que o valor mais elevado não é um resultado anómalo.

72. O relatório do ensaio deve incluir as seguintes informações:

Produto químico em estudo:

— denominação comum, denominação química, número CAS, fórmula estrutural e propriedades físico-químicas pertinentes,

— grau de pureza do produto químico (presença de impurezas).

Condições experimentais:

— referência ao presente método,

— descrição do sistema de ensaio utilizado (por exemplo, volume dos recipientes, proporção espaço livre/volume de líquido, método de agitação, etc.),

— introdução do produto químico em estudo e do produto químico de referência no sistema de ensaio: concentração de ensaio utilizada, e quantidade de carbono introduzida, em cada frasco de ensaio, bem como os solventes eventualmente utilizados,

— pormenores relativos ao inóculo utilizado, bem como a qualquer pré-tratamento e pré-acondicionamento,

— temperatura de incubação,

— validação do princípio de análise do carbono inorgânico,

— principais características do analisador de carbono inorgânico (e de quaisquer outros métodos analíticos utilizados),

— número de replicados.

Resultados:

— dados não tratados e valores de biodegradabilidade calculados, na forma de quadros,

▼M4

— gráfico da percentagem de degradação em função do tempo, para o produto químico em estudo e o produto químico de referência, fase de latência, fase de degradação, período de 10 dias e declive,

— percentagem de remoção na fase de patamar, no final do ensaio e após o período de 10 dias,

— motivos de uma eventual rejeição de resultados dos ensaios,

— quaisquer outros factos relevantes ligados ao procedimento seguido,

— discussão dos resultados.

REFERÊNCIAS:

(1) Capítulo C.4 deste anexo: "Determinação da biodegradabilidade 'fácil' — Ensaio da libertação de CO_2" (método C.4-C).

(2) Sturm R.N. (1973): Biodegradability of Nonionic surfactants: screening test for predicting rate and ultimate biodegradation. *J. A. Oil Chem. Soc*. 50: 159-167.

(3) Larson R.J. (1979): Estimation of biodegradation potential of xenobiotic organic chemicals. *Appl. Env. Microbiol*. 38: 1153-1161.

(4) Larson R.J., Hansmann M.A., Bookland E.A. (1996): Carbon dioxide recovery in ready biodegradability tests: mass transfer and kinetic constants. *Chemosphere* 33: 1195-1210.

(5) ISO 9439 (1990; revista em 1999). Water Quality — Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in aqueous medium — Carbon dioxide evolution Test (Sturm).

(6) US EPA (1996). Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3110 Carbon dioxide evolution test. Office Prevention Pesticides and Toxic Substances. Washington, DC.

(7) US EPA (1996). Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3100. Aerobic aquatic biodegradation. Office Prevention Pesticides and Toxic Substances. Washington, DC.

(8) Gledhill W.E. (1975). Screening test for assessment of biodegradability: Linear alkyl benzene sulfonate. *Appl. Microbiol*. 30: 922-929.

(9) Weytjens D., Van Ginneken I., Painter H.A. (1994): The recovery of carbon dioxide in the Sturm test for ready biodegradability. *Chemosphere* 28: 801--812.

(10) Ennis D.M., Kramer A. (1975): A rapid microtechnique for testing biodegradability of nylons and polyamides. *J. Food Sci*. 40: 181-185.

(11) Ennis D.M., Kramer A., Jameson C.W., Mazzoccki P.H., Bailey P. (1978). *Appl. Env. Microbiol*. 35: 51-53.

(12) Boatman R., Cunningham S.L., Ziegler D.A. (1986). A method for measuring the biodegradation of organic chemicals. *Env. Toxicol. Chem*. 5: 233--243.

(13) Struijs J., Stoltenkamp J. (1990): Head space determination of evolved carbon dioxide in a biodegradability screening test. *Ecotox. Env. Safety* 19: 204-211.

(14) Birch R.R., Fletcher R.J. (1991): The application of dissolved inorganic carbon measurements to the study of aerobic biodegradability. *Chemosphere* 23: 507-524.

(15) Birch R.R., Biver C., Campagna R., Gledhill W.E., Pagga U., Steber J., Reust H., Bontinck W.J. (1989): Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. *Chemosphere* 19: 1527-1550.

▼**M4**

(16) ISO 14593 (1999) Water Quality — Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in an aerobic medium-method by analysis of inorganic carbon in sealed vessels ($C0_2$ headspace test).

(17) Battersby N.S. (1997): The ISO headspace $C0_2$ biodegradation test. *Chemosphere* 34: 1813-1822.

(18) US EPA (1996). Fate, Transport and Transportation. 835.3120. Sealed vessel carbon dioxide production test. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substance. Washington, DC.

(19) Battersby N.S., Ciccognani D., Evans M.R., King D., Painter H.A., Peterson D.R., Starkey M. (1999): An "inherent" biodegradability test for oil products: description and results of an international ring test. *Chemosphere* 38: 3219-3235.

(20) Capítulo C.4 deste anexo: "Determinação da biodegradabilidade 'fácil'".

(21) OCDE (1988). OECD Ring-test of methods for determining ready biodegradability: Chairman's report (M. Hashimoto; MITI) and final report (Kitano, M., Takatsuki, M.; CITI). Paris.

(22) Capítulo C.11 deste anexo: "Biodegradação — Lamas Ativadas: Ensaios de Inibição da Respiração".

(23) Struijs J., Stoltenkamp-Wouterse M.J., Dekkers A.L.M. (1995): A rationale for the appropriate amount of inoculum in ready biodegradability tests. *Biodegradation* 6: 319-327.

(24) UE (1999). Ring-test of the ISO Headspace CO_2 method: application to surfactants: Surfactant Ring Test-1, Report EU4697. Water Research Centre, Maio de 1999. Medmenham, SL7 2HD, Reino Unido.

(25) ISO 10634 (1996). Water Quality — Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

▼M4

Apêndice 1

ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

CI: carbono inorgânico.

CO_2Te: o dióxido de carbono teórico (mg) é a quantidade calculada do dióxido de carbono que seria produzido a partir do teor de carbono medido ou conhecido do produto químico em estudo, quando totalmente mineralizado; também pode ser expresso em mg de dióxido de carbono libertado por mg de produto químico em estudo.

COD: o carbono orgânico dissolvido é o carbono orgânico presente na solução ou que passa através de um filtro de 0,45 micra ou que permanece no sobrenadante após centrifugação a cerca de 4 000 g (aproximadamente 40 000 ms^{-2}) durante 15 minutos.

CID: carbono inorgânico dissolvido.

CITe: carbono inorgânico teórico.

CIT: carbono inorgânico total.

Facilmente biodegradável: classificação arbitrária atribuída aos produtos químicos que satisfazem os critérios de determinados ensaios específicos de verificação da biodegradabilidade total; dado o grau de exigência destes ensaios, presume-se que esses produtos químicos são fácil e completamente biodegradados num ambiente aquático, em condições aeróbias.

Período de dez dias: período de dez dias imediatamente após ter sido alcançado o nível de biodegradação de 10 %.

Biodegradabilidade inerente: classificação atribuída aos produtos químicos para os quais existem provas inequívocas de biodegradação (primária ou total) num ensaio de biodegradabilidade.

Biodegradação aeróbia total: nível de degradação alcançado quando o produto químico em estudo é totalmente consumido pelos microrganismos, produzindo dióxido de carbono, água, sais minerais e novos componentes celulares microbianos (biomassa).

Mineralização: degradação completa de um produto químico orgânico em CO_2 e H_2O, em condições aeróbias, ou em CH_4, CO_2 e H_2O, em condições anaeróbias.

Fase de latência: período que decorre do início do ensaio até à aclimatação e/ou adaptação dos microrganismos responsáveis pela degradação e ao surgimento de um grau detetável de biodegradação do produto químico ou matéria orgânica em estudo (p. ex.: 10 % da biodegradação teórica máxima, ou menos, consoante a precisão da técnica de medição).

Fase de degradação: período que decorre do final da fase de latência até ao momento em que se atinge 90 % da degradação máxima.

Fase de patamar: fase na qual já se atingiu a degradação máxima e a curva de biodegração estabiliza.

Produto químico em estudo: qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado o presente método de ensaio.

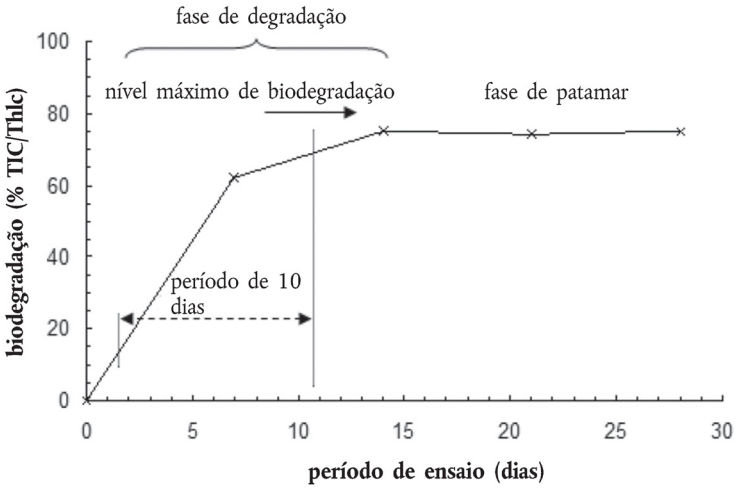
▼M4

Apêndice 2

Exemplo de curva de biodegradação

Figura 1

Biodegradação do 1-octanol no ensaio do CO_2 no espaço livre



Glossário

biodegradação

fase de degradação

nível máximo de biodegradação

fase de patamar

período de 10 dias

período de ensaio (dias)

▼M4

C.30. BIOACUMULAÇÃO EM OLIGOQUETAS TERRESTRES

INTRODUÇÃO

1. Este método de ensaio é equivalente ao da *Test Guideline 317* (TG 317) da OCDE (2010). Entre os métodos de ensaio relativos ao destino ambiental, foram publicados, respetivamente em 1996 e em 2008, "Bioconcentração: ensaio dinâmico no peixe" — capítulo C.13 deste anexo (49) e "Bioacumulação em oligoquetas bentónicos sedimentares" (53). A extrapolação dos dados de bioacumulação em meio aquático para organismos terrestres como as minhocas é difícil, senão impossível. São atualmente utilizados modelos de cálculo baseados na lipofilia do produto químico — p. ex., 14 e 37 — para avaliar a bioacumulação de produtos químicos no solo, tal como consta, por exemplo, do documento de orientação técnica da UE (19). A necessidade de um método de ensaio aplicável ao compartimento específico foi já abordada — p. ex., 55. Um tal método é particularmente importante para avaliar o envenenamento secundário nas cadeias alimentares terrestres (4). Há diversos métodos de ensaio nacionais que têm por objeto a bioacumulação noutros organismos que não os peixes — p. ex., 2 e 72. A *American Society for Testing and Materials* preparou um método de medição da bioacumulação causada por solos contaminados em minhocas (*Eisenia fetida*, Savigny) e oligoquetas da família *Enchytraeidae* (3). Um método internacionalmente aceite para a determinação da bioacumulação num solo enriquecido com determinado produto químico irá melhorar a avaliação dos riscos dos produtos químicos nos ecossistemas terrestres — p. ex., 25 e 29.

2. Os invertebrados geófagos estão expostos aos produtos químicos presentes no solo. Entre eles, os oligoquetas terrestres desempenham um papel importante na estrutura e na função dos solos (15)(20). Vivem no solo e, em parte, à superfície (sobretudo na manta morta) e representam frequentemente as espécies mais abundantes em termos de biomassa (54). Por causarem bioturbação do solo e por servirem de presa, estes animais podem ter grande influência na biodisponibilização de produtos químicos a outros organismos predadores, quer invertebrados — p. ex., ácaros e coleópteros, cf. 64 —, quer vertebrados — p. ex., raposas e gaivotas, cf. 18 e 62. No apêndice 5 são referidas algumas espécies de oligoquetas terrestres atualmente utilizadas em ensaios ecotoxicológicos.

3. O guia da ASTM para ensaios laboratoriais de toxicidade do solo e de bioacumulação na minhoca *Eisenia fetida* e no oligoqueta *Enchytraeus albidus* (3) fornece muitas informações essenciais e úteis para a execução deste método de ensaio da bioacumulação no solo. Outros documentos referidos neste método de ensaio são o capítulo C.13 — "Bioconcentração: ensaio dinâmico no peixe" (49) — deste anexo e o *Test Guideline 315* da OCDE — *Bioaccumulation on Sediment-dwelling Benthic Oligochaetes* (bioacumulação em oligoquetas bentónicos sedimentares), (53). Os resultados práticos referidos em estudos e publicações sobre bioacumulação no solo — p. ex., 1, 5, 11, 12, 28, 40, 43, 45, 57, 59, 76, 78 e 79 — são também uma importante fonte de informação para este método de ensaio.

4. O método é maioritariamente aplicável a produtos químicos orgânicos neutros e estáveis, que têm tendência para ser adsorvidos no solo. Permite estudar a bioacumulação de compostos organometálicos estáveis que se associam ao solo e é também aplicável a metais e outros oligoelementos.

CONDIÇÃO PRÉVIA

5. Para medir a bioacumulação de um produto químico em oligoquetas terrestres, foram realizados ensaios com metais pesados — p. ex., 63 — e com produtos químicos orgânicos persistentes que acusam valores de log K_{ow} entre 3,0 e 6,0 — p. ex., 40. Esses ensaios também se aplicam a:

— produtos químicos com log K_{ow} superior a 6,0 (superidrofóbicos),

▼M4

— produtos químicos pertencentes a classes de produtos químicos orgânicos com potencial reconhecido de bioacumulação em organismos vivos (por exemplo, produtos químicos tensioativos ou altamente adsorvíveis),

— produtos químicos com potencial de bioacumulação dedutível das suas características estruturais (por exemplo, análogos de produtos químicos com potencial de bioacumulação conhecido) e

— metais.

6. Antes de se iniciar o estudo, devem ser obtidos elementos identificativos do produto químico em causa, como: nome comum, denominação química (preferivelmente a denominação IUPAC), fórmula estrutural, número de registo CAS, grau de pureza, precauções de segurança, condições de conservação adequadas e métodos de análise. Devem também ser conhecidos os seguintes dados:

a) solubilidade em água;

b) coeficiente de partição octanol/água, K_{ow};

c) coeficiente de partição solo-água, expresso como K_{oc};

d) pressão de vapor;

e) degradabilidade (por exemplo, no solo e na água);

f) metabolitos conhecidos.

7. Podem ser utilizados no estudo produtos químicos com ou sem marcação radioativa. No entanto, para facilitar a análise, recomenda-se a utilização dos primeiros. A decisão deve ser tomada com base nos limites de deteção ou na obrigatoriedade de medir o produto químico parental e os seus metabolitos. Se for utilizado um produto químico com marcação radioativa e forem medidos os resíduos radioativos totais, importa que os resíduos com marcador radioativo presentes quer no solo quer nos organismos em estudo sejam caracterizados em termos de percentagem de produto químico parental e de percentagens de produtos químicos marcados não parentais — por exemplo, em amostras recolhidas em estado estacionário ou no final da fase de absorção — para permitir calcular o fator de bioacumulação (BAF) do produto químico parental e dos metabolitos pertinentes deste no solo (cf. ponto 50). O método aqui descrito poderá ter de ser modificado — por exemplo, a fim de se dispor de biomassa suficiente — para medir produtos químicos orgânicos sem marcação radioativa ou metais. Na medição dos resíduos radioativos totais (por contagem de cintilação em meio líquido após extração, combustão ou solubilização dos tecidos), o fator de bioacumulação baseia-se no produto químico parental e nos metabolitos deste. O cálculo do BAF deve preferencialmente ter por base a concentração do produto químico parental nos organismos e os resíduos radioativos totais. Seguidamente, por razões de comparabilidade entre os resultados dos diversos ensaios de bioacumulação, calcula-se a partir do BAF o fator de acumulação biota-solo (BSAF), normalizado em relação ao teor de lípidos dos vermes e ao teor de carbono orgânico do solo.

8. A toxicidade do produto químico em estudo para as espécies utilizadas no ensaio deve ser conhecida: por exemplo, a concentração com efeitos (CE_x) ou a concentração letal (CL_x) relativas ao tempo de duração da fase de absorção — p. ex., 19. A concentração do produto químico em estudo deve ser, preferencialmente, cerca de 1 % da CL_{50} aguda assintótica do mesmo e pelo menos dez vezes superior ao limite de deteção do prosuto químico no solo pelo método de análise utilizado. Se possível, deve ser dada preferência a valores de toxicidade derivados de estudos de longa duração a efeitos subletais (51)(52). Se não estiverem disponíveis tais dados, um teste de toxicidade aguda dará informações úteis — p. ex., 23.

▼M4

9. Deve dispor-se de um método de análise adequado, com exatidão, precisão e sensibilidade conhecidas, para determinar quantitativamente o produto químico nas soluções de ensaio, no solo e na matéria biológica, juntamente com os pormenores da preparação e da armazenagem das amostras e as correspondentes fichas de dados de segurançal. Devem também ser conhecidos os limites analíticos de deteção do produto químico no solo e nos tecidos dos vermes. Se for utilizado no ensaio um produto químico marcado com ^{14}C, devem ser conhecidas a radioatividade específica (em $Bq.mol^{-1}$) e a percentagem de radioatividade associada a impurezas. A radioatividade específica do produto químico em estudo deve ser suficientemente elevada para facilitar as análises, e as concentrações de ensaio não devem induzir efeitos tóxicos.

10. O ensaio pode ser executado com solo artificial ou natural. Antes de se iniciar o ensaio, importa conhecer as características do solo natural utilizado, como, por exemplo, a origem ou os componentes do solo, o pH, o teor de carbono orgânico, a distribuição granulométrica (percentagem de areia, de limo e de argila) e a capacidade de retenção de água — (3)(48).

PRINCÍPIO DO ENSAIO

11. Os parâmetros que caracterizam a bioacumulação de um produto químico incluem o fator de bioacumulação (BAF), a constante de velocidade de absorção (k_s) e a constante de velocidade de eliminação (k_e). Estes parâmetros são definidos no apêndice 1.

12. O ensaio compreende duas fases: a fase de absorção (exposição) e a fase de eliminação (pós-exposição). Durante a fase de absorção, são expostos ao solo, previamente enriquecido com o produto químico em estudo, grupos replicados de vermes. Paralelamente aos vermes cobaias, mantêm-se em condições idênticas, mas sem o produto químico em estudo, grupos de vermes de controlo. Mede-se a massa seca e o teor de lípidos dos organismos sujeitos ao ensaio. Para o efeito, podem utilizar-se vermes do grupo de controlo. Os valores de fundo analíticos (ensaios em branco) podem ser obtidos analisando amostras dos vermes de controlo e do solo. Para a fase de eliminação, os vermes são transferidos para um solo isento do produto químico em estudo. É sempre necessária uma fase de eliminação, a menos que a absorção do produto químico durante a fase de exposição tenha sido insignificante. A fase de eliminação fornece informações sobre a velocidade à qual o produto químico é excretado pelos organismos sujeitos ao ensaio — p. ex., 27. Se, durante a fase de absorção, não tiver sido atingido um estado estacionário, a determinação dos parâmetros cinéticos — fator de bioacumulação cinético BAFk, constante de velocidade de absorção e constante de velocidade de eliminação — deve basear-se preferencialmente num ajustamento simultâneo aos resultados das fases de absorção e de eliminação. A concentração do produto químico no interior ou à superfície dos vermes é monitorizada ao longo de ambas as fases do ensaio.

13. Durante a fase de absorção, são feitas medições a intervalos de amostragem que podem chegar a 14 dias (família *Enchytraeidae*) ou a 21 dias (minhocas) até ser atingido o estado estacionário (11)(12)(67). O estado estacionário ocorre quando o gráfico da concentração nos vermes em função do tempo é paralelo ao eixo do tempo, e três análises sucessivas da concentração feitas em amostras colhidas a intervalos de pelo menos dois dias variam entre si, no máximo, 20 %, com base em comparações estatísticas (p. ex., análise da variância, análise de regressão).

14. A fase de eliminação consiste em transferir os organismos sujeitos ao ensaio para recipientes que contêm o mesmo substrato, mas sem o produto químico em estudo. Durante a fase de eliminação, são feitas medições a intervalos de amostragem que podem chegar a 14 dias (família *Enchytraeidae*) ou a 21 dias (minhocas), a menos que determinações analíticas anteriores tenham mostrado uma redução de 90 % dos resíduos do produto químico nos vermes. A concentração do produto químico nos vermes no final da fase de

▼M4

eliminação é indicada como correspondente a resíduos não eliminados. O fator de bioacumulação em estado estacionário (BAF_{ss}) é calculado preferencialmente como quociente entre a concentração nos vermes (C_a) e a concentração no solo (C_s) em estado estacionário aparente e também como fator de bioacumulação cinético, BAF_K, dado pelo quociente entre a constante de velocidade de absorção do solo (k_s) e a constante de velocidade de eliminação (k_e) (ver definições no apêndice 1), assumindo uma cinética de primeira ordem (ver cálculos no apêndice 2). Se a cinética de primeira ordem for manifestamente inaplicável, devem ser empregues outros modelos.

15. A constante de velocidade de absorção, a constante de velocidade de eliminação (ou as constantes, se forem utilizados outros modelos), o fator de bioacumulação cinético (BAF_K) e, se possível, os limites de confiança de cada um destes parâmetros são calculados por meios informáticos a partir de equações de modelo (ver orientações no apêndice 2). A adequação de um modelo pode ser determinada a partir, por exemplo, do coeficiente de correlação ou do coeficiente de determinação (coeficientes próximos de 1 indicam boa adequação) ou da lei do qui-quadrado. A amplitude do erro-padrão ou do limite de confiança dos parâmetros estimados pode também dar uma boa indicação da adequação do modelo.

16. Para reduzir a variabilidade dos resultados dos ensaios de produtos químicos muito lipofílicos, os fatores de bioacumulação devem ser expressos em relação ao teor de lípidos e ao teor de carbono orgânico (kg de carbono orgânico no solo. kg^{-1} de lípidos nos vermes). Esta abordagem baseia-se no facto de que, para algumas classes de produtos químicos, há uma relação clara entre o potencial de bioacumulação e a lipofilia, relação essa bem estabelecida no caso dos peixes (47). Há uma relação entre o teor de lípidos dos peixes e a bioacumulação dos produtos químicos em causa. Em organismos bentónicos, foram descobertas correlações similares — p. ex., 30 e 44. Esta correlação foi igualmente demonstrada em oligoquetas terrestres — p. ex., 5, 6, 7 e 14. Se se dispuser de tecido suficiente, o teor de lípidos dos vermes sujeitos ao ensaio pode ser determinado na mesma matéria biológica utilizada para determinar a concentração do produto químico em estudo. Alternativamente, podem utilizar-se animais de controlo para medir o teor de lípidos.

VALIDADE DOS ENSAIOS

17. Para que um ensaio seja válido, devem ser cumpridos os seguintes critérios, quer por parte dos organismos de controlo quer por parte dos organismos expostos:

— no final do ensaio, a mortalidade total durante as fases de absorção e de eliminação não pode exceder 10 % (minhocas) ou 20 % (família *Enchytraeidae*) do número total de vermes introduzidos;

— para *Eisenia fetida* e *E. andrei*, a perda média de massa, medida no final da fase de absorção e no final da fase de eliminação, não pode exceder 20 % da massa fresca inicial da respetiva fase.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Espécies sujeitas a ensaio

18. Para estudar a bioacumulação, recomenda-se várias espécies de oligoquetas terrestres. As mais utilizadas — *Eisenia fetida* ou *E. andrei* (família *Lumbricidae*) e *Enchytraeus albidus*, *E. crypticus* ou *E. luxuriosus* (família *Enchytraeidae*) — são descritas no apêndice 5.

▼M4

Dispositivos

19. Deve ser evitada a utilização, em qualquer parte do equipamento, de materiais capazes de dissolver ou adsorver o produto químico em estudo ou de permitir fugas de outros produtos químicos ou que tenham um efeito adverso nos animais sujeitos ao ensaio. Servem recipientes normalizados retangulares ou cilíndricos, de materiais quimicamente inertes e com capacidade adequada à carga, isto é, ao número de vermes sujeitos ao ensaio. Pode ser utilizado aço inoxidável, plástico ou vidro em qualquer equipamento que entre em contacto com os meios de ensaio. Os recipientes de ensaio devem ser adequadamente cobertos para impedir a fuga dos vermes, mas permitindo uma entrada de ar suficiente. No caso de produtos químicos com coeficiente de adsorção elevado, como os piretroides sintéticos, pode ser necessário vidro silanizado. Em tais situações, importa descartar o equipamento após a utilização (49). Devem ser impedidas fugas de produtos químicos com marcação radioativa e de produtos químicos voláteis. Devem ser utilizadas armadilhas (por exemplo, garrafas de vidro para lavagem de gases) contendo absorventes capazes de reter os resíduos que se evaporem dos recipientes de ensaio.

Solo

20. A qualidade do solo ensaiado deve permitir a sobrevivência e, preferivelmente, a reprodução dos organismos durante os períodos de aclimatação e de ensaio, sem apresentarem aspeto ou comportamento anormal. É necessário que os vermes se enterrem no solo.

21. Como substrato para o ensaio é recomendado o solo artificial descrito no capítulo C.8 deste anexo — (48). No apêndice 4 é descrita a preparação do solo artificial a utilizar nos ensaios de bioacumulação e são feitas recomendações sobre a armazenagem de solos artificiais. O solo artificial seco ao ar pode ser armazenado à temperatura ambiente até à sua utilização.

22. Contudo, também solos naturais de locais não poluídos podem servir para ensaio e/ou para cultura. Devem conhecer-se, no mínimo, as suas características seguintes: origem (local de recolha), pH, teor de carbono orgânico, distribuição granulométrica (percentagem de areia, de limo e de argila), capacidade máxima de retenção de água (WHC_{max}) e teor percentual de água (3). A pesquisa de micropoluentes no solo ou nos seus componentes antes da utilização deverá proporcionar informações úteis. Caso se utilize solo natural proveniente de terras agrícolas, as amostras não devem ser colhidas menos de um ano após o último tratamento com produtos fitofarmacêuticos ou da última aplicação de estrume de animais, nem menos de seis meses após o último tratamento com fertilizantes orgânicos (50). Na referência 3 são descritos procedimentos de manipulação de solos naturais antes da sua utilização em ensaios laboratoriais de ecotoxicologia com oligoquetas. O tempo de armazenagem de solos naturais em laboratório deve ser o mais curto possível.

Aplicação do produto químico em estudo

23. O produto químico é incorporado no solo. As suas propriedades físico-químicas devem ser tidas em conta. Os produtos químicos hidrossolúveis devem ser completamente dissolvidos em água antes da sua mistura com o solo. O procedimento de enriquecimento recomendado para produtos químicos pouco hidrossolúveis consiste em incorporar o produto químico em estudo num ou mais dos componentes do solo (artificial). Por exemplo, a areia quartzítica (ou uma parte dela) pode ser embebida numa solução do produto químico com um solvente orgânico adequado que, em seguida, é lentamente evaporado até a areia secar. A fração impregnada pode então ser misturada com o solo humedecido. A grande vantagem deste procedimento é que não se introduz nenhum solvente no solo. Se for utilizado solo natural, o produto químico em estudo pode ser adicionado enriquecendo, pelo método atrás

▼M4

descrito para solo artificial, uma porção do solo seca ao ar, ou misturando o produto químico no solo húmido, com subsequente evaporação se se tiver utilizado um agente solubilizante. Em geral, deve evitar-se o mais possível o contacto de solo húmido com solventes. Ter em conta o seguinte (3):

— se se utilizar um solvente que não água, importa que seja hidromiscível e/ou possa ser removido (por evaporação, por exemplo,), deixando no solo apenas o produto químico em estudo,

— se se recorrer a um controlo do solvente, não é necessário controlo negativo. O controlo do solvente deve conter a mais elevada concentração de solvente adicionado ao solo e utilizar solvente do mesmo lote que serviu para preparar a solução-mãe. A toxicidade e a volatilidade do solvente e a solubilidade do produto químico em estudo no solvente escolhido devem ser os critérios principais para a seleção de um agente solubilizante adequado.

24. No caso dos produtos químicos pouco solúveis em água ou em solventes orgânicos, podem misturar-se (com almofariz e pilão, por exemplo,) 2,0-2,5 g de areia quartzítica finamente moída por cada recipiente de ensaio com a quantidade do produto químico em estudo, até obter a concentração de ensaio desejada. Esta mistura de areia quartzítica e produto químico é misturada cuidadosamente com o solo previamente humedecido, adicionando água desionizada até obter o teor de humidade necessário. A mistura final é distribuída pelos recipientes de ensaio. Repete-se o procedimento para cada concentração de ensaio e prepara-se também um controlo adequado, com 2,0-2,5 g de areia quartzítica finamente moída em cada recipiente.

25. Após o enriquecimento, determina-se a concentração do produto químico no solo. A distribuição homogénea do produto no solo deve ser verificada antes de se introduzirem os organismos que vão ser sujeitos ao ensaio. Deve indicar-se o método utilizado para o enriquecimento, bem como as razões da escolha de um determinado procedimento de enriquecimento (24).

26. Antes de se adicionar os organismos, deve, idealmente, estabelecer-se um equilíbrio entre o solo e a água intersticial, para o que se recomenda um período de quatro dias a 20 °C. Para muitos produtos químicos orgânicos pouco hidrossolúveis, o tempo necessário para alcançar um verdadeiro equilíbrio entre as frações adsorvida e dissolvida pode ser de dias ou meses. Dependendo da finalidade do estudo — por exemplo, quando se trata de imitar as condições ambientais —, o solo enriquecido poderá ter de ser "envelhecido" por um período mais longo — por exemplo, no caso dos metais, três semanas a 20 °C (22).

Cultura dos organismos a ensaiar

27. De preferência, deve ter-se uma cultura permanente dos vermes no laboratório. O apêndice 5 dá orientações sobre métodos de cultura laboratorial de *Eisenia fetida* e de *E. andrei*, bem como de espécies da família *Enchytraeidae* — ver também 48, 51 e 52.

28. Os vermes utilizados nos ensaios devem estar isentos de doenças, anomalias e parasitas visíveis.

REALIZAÇÃO DO ENSAIO

29. Os organismos sujeitos a ensaio são expostos ao produto químico em estudo durante a fase de absorção, que deve durar 14 dias (família *Enchytraeidae*) ou 21 dias (minhocas), a menos que se demonstre que o estado estacionário foi alcançado.

▼M4

30. Para a fase de eliminação, os vermes são transferidos para um solo isento do produto químico em estudo. A primeira amostra deve ser colhida entre 4 e 24 horas após o início da fase de eliminação. O apêndice 3 contém exemplos de programação da colheita de amostras para uma fase de absorção de 21 dias e uma fase de eliminação de 21 dias.

Organismos sujeitos aos ensaios

31. Em muitas espécies terrestres da família *Enchytraeidae*, a massa individual é bastante baixa (por exemplo, 5-10 mg de massa húmida por indivíduo no caso de *Enchytraeus albidus* e menos no caso de *E. crypticus* ou *E. luxuriosus*). Para efetuar as pesagens e as análises químicas, pode ser necessário juntar os vermes de cada recipiente de replicação (ou seja, todos os vermes de um recipiente de replicação para se obter um resultado único de análise de tecido). A cada replicado são adicionados vinte espécimes de *Enchytraeidae*, devendo ser utilizados pelo menos três replicados. Se o limite de deteção analítico do produto químico em estudo for elevado, poderão ser necessários mais vermes. Para as espécies com maior massa individual (*Eisenia fetida* e *E. andrei*), podem ser utilizados recipientes de replicação com um só espécime.

32. As minhocas utilizadas num ensaio devem ter massa similar (por exemplo, cada espécime de *Eisenia fetida* e *E. andrei* deve ter massa de 250-600 mg). Os espécimes da família *Enchytraeidae* (por exemplo, da espécie *Enchytraeus albidus*) devem ter um comprimento de aproximadamente 1 cm. Todos os vermes utilizados num ensaio devem provir da mesma fonte e ser adultos com clitélio (ver apêndice 5). Uma vez que a massa e a idade do animal podem ter influência nos valores do BAF (por exemplo, devido a variações no teor de lípidos e/ou à presença de ovos), tais parâmetros devem ser registados com exatidão e tidos em conta na interpretação dos resultados. Por outro lado, durante o período de exposição, podem surgir casulos de ovos, o que terá também efeito nos valores do BAF. Recomenda-se a pesagem de uma subamostra dos vermes antes do ensaio, a fim de estimar os valores médios da massa húmida e da massa seca.

33. Deve utilizar-se um rácio elevado solo/vermes, a fim de minimizar o decréscimo da concentração do produto químico no solo durante a fase de absorção. Para as espécies *Eisenia fetida* e *E. andrei*, recomenda-se um valor mínimo de 50 g de massa seca de solo por cada verme e, para a família *Enchytraeidae*, um mínimo de 10-20 g de massa seca de solo por cada recipiente de ensaio. Os recipientes devem conter uma camada de solo de 2-3 cm no caso de vermes da família *Enchytraeidae* ou de 4-5 cm no caso das minhocas.

34. Os vermes a ensaiar são retirados da cultura (no caso da família *Enchytraeidae*, por exemplo, com recurso a pinças de joalheiro). Transfere-se animais adultos para solo não tratado, para aclimatação, e alimentam-se (cf. ponto 36). Se as condições de ensaio diferirem das condições de cultura, deverá ser suficiente uma fase de aclimatação de 24-72 horas para adaptar os vermes às condições de ensaio. Terminada a aclimatação, os vermes são transferidos para vasos de vidro (por exemplo, placas de Petri) com água limpa, para ser lavados, e em seguida são pesados, antes da sua colocação no solo de ensaio. Antes da pesagem, a água em excesso deve ser removida dos vermes, percutindo-os delicadamente contra as bordas da placa ou secando-os com cuidado por meio de um toalhete de papel ligeiramente humedecido.

35. Deve observar-se e registar-se o comportamento dos organismos sujeitos a ensaio, em termos de enterramento no solo. Nos ensaios com minhocas, os animais (de controlo ou expostos) enterram-se normalmente ao cabo de algumas horas; este comportamento deve ser confirmado, o mais tardar, 24 h após a colocação dos vermes nos recipientes de ensaio. Se as minhocas não se enterrarem (por exemplo, mais de 10 % delas ao cabo de mais de metade da fase de absorção), é sinal de que as condições do ensaio não são adequadas ou de que as minhocas não estão saudáveis. Nesse caso, o ensaio deve ser interrompido e repetido. Os vermes da família *Enchytraeidae* vivem

▼M4

sobretudo nos poros intersticiais do solo e é frequente o seu tegumento estar só parcialmente em contacto com o substrato circundante; considera-se que, nesta família, a exposição dos vermes que se enterram é equivalente à dos que não se enterram, pelo que a ausência de enterramento não exige necessariamente a repetição do ensaio.

Alimentação

36. É necessário alimentar os vermes quando se utiliza um solo com baixo teor de carbono orgânico total. Caso se utilize um solo artificial, recomenda-se uma frequência de alimentação semanal (ou seja, os vermes são alimentados uma vez por semana), com 7 mg de esterco seco por 1 g de solo seco no caso das minhocas e com 2-2,5 mg de flocos de aveia moídos por 1 g de solo seco no caso da família *Enchytraeidae* (11). A primeira ração alimentar deve ser misturada com o solo imediatamente antes da colocação dos organismos a ensaiar. É preferível utilizar o mesmo tipo de alimento que nas culturas (ver apêndice 5).

Luz e temperatura

37. Os ensaios devem ser realizados segundo um ciclo controlado de 16 horas de luz e 8 de obscuridade, preferencialmente com uma intensidade de 400-800 lx na zona dos recipientes de ensaio (3). A temperatura deve ser de 20 ± 2 °C ao longo de todo o ensaio.

Concentrações de ensaio

38. É utilizada uma única concentração. As situações em que se exijam concentrações adicionais devem ser justificadas. Se a toxicidade (CE_x) do produto químico em estudo for próxima do limite de deteção analítico, recomenda-se a utilização de um produto químico marcado radioativamente com elevada radioatividade específica. Para metais, a concentração deve ser superior ao nível de fundo nos tecidos e no solo.

Replicados

39. Para as medições cinéticas (fase de absorção e fase de eliminação), o número mínimo de recipientes de replicação expostos é de três por cada ponto de amostragem. O número total de replicados preparados deve ser suficiente para abranger todos os tempos de amostragem durante a fase de absorção e a fase de eliminação.

40. Para as observações e medições biológicas (quociente entre massa seca e massa húmida, teor de lípidos, etc.) e para a análise das concentrações de fundo nos vermes e no solo, devem ser constituídos pelo menos doze recipientes de replicação de um controlo negativo (colheita de amostras em quatro recipientes no início da fase de absorção, em quatro no final da fase de absorção e em quatro no final da fase de eliminação), se não tiver sido utilizado outro solvente além da água. Se for utilizado um qualquer agente solubilizante para a aplicação do produto químico em estudo, deve-se ensaiar, além dos replicados expostos, um controlo do solvente (colheita de amostras em quatro recipientes de replicação no início da fase de absorção, em quatro no final da fase de absorção e em quatro no final da fase de eliminação), contendo todos os componentes, com exceção do produto químico em estudo. Neste caso, podem também ser constituídos quatro recipientes de replicação adicionais de um controlo negativo (sem solvente), para amostragem opcional no final da fase de absorção. Estes replicados podem ser comparados biologicamente com o controlo do solvente a fim de obter informações sobre uma eventual influência do solvente nos organismos sujeitos ao ensaio. Recomenda-se a constituição de um número suficiente de recipientes de replicação adicionais de reserva (por exemplo, oito) para exposição e controlo(s).

▼M4

Frequência das medições da qualidade do solo

41. No início e no final da fase de absorção e da fase de eliminação medem-se o pH e o teor de humidade do solo. A temperatura no local do ensaio é medida continuamente. O teor de humidade do solo deve ser verificado uma vez por semana, pesando os recipientes de ensaio e comparando as massas obtidas com as massas iniciais (isto é, no início do ensaio). As perdas de água devem ser repostas com água desionizada.

Colheita de amostras e análise dos vermes e do solo

42. O apêndice 3 contém exemplos de programação da colheita de amostras para a fase de absorção e para a fase de eliminação em ensaios de bioacumulação realizados com minhocas e com vermes da família *Enchytraeidae*.

43. Antes da colocação dos vermes, durante a fase de absorção e durante a fase de eliminação, colhe-se amostras de solo dos recipientes de ensaio para determinar a concentração do produto químico em estudo. Durante o ensaio, determina-se as concentrações do produto químico nos vermes e no solo. Em geral, mede-se as concentrações totais no solo. Facultativamente, pode medir-se as concentrações na água intersticial, caso em que, antes do início do estudo, deve conhecer-se os fundamentos disso e deve dispor-se dos métodos adequados (elementos a incluir posteriormente no relatório).

44. Colhe-se amostras dos vermes e do solo em, pelo menos, seis ocasiões durante a fase de absorção e a fase de eliminação. Se a estabilidade do produto químico em estudo for demonstrada, pode reduzir-se o número de análises ao solo. Recomenda-se a análise de, pelo menos, três replicados no início e no final da fase de absorção. Se a concentração no solo medida no final da fase de absorção diferir em mais de 30 % da medida no início, devem também ser analisadas as amostras de solo colhidas noutras datas.

45. A cada tempo de colheita de amostras, os vermes do replicado em causa são retirados do solo (por exemplo, espalhando o solo do replicado sobre um tabuleiro raso e colhendo os vermes com pinças de joalheiro) e lavados rapidamente em água num tabuleiro raso de vidro ou aço. Remove-se a água em excesso (cf. ponto 34). Transfere-se os vermes cuidadosamente para um recipiente previamente tarado e pesando-se de imediato, incluindo o conteúdo do trato digestivo.

46. No caso das minhocas (*Eisenia* sp.), deixam-se evacuar o trato digestivo de um dia para o outro — por exemplo, sobre papel de filtro humedecido, numa placa de Petri coberta (cf. ponto 34). Após essa purga, determina-se a massa dos vermes, a fim de avaliar um eventual decréscimo da biomassa durante o ensaio (ver critérios de validade no ponto 17). No caso dos vermes da família *Enchytraeidae*, a pesagem e a análise de tecidos são efetuadas sem purga do trato digestivo, por esta ser tecnicamente difícil devido às pequenas dimensões destes animais. Terminada a pesagem final, os vermes devem ser occisados de imediato, pelo método mais adequado (por exemplo, com azoto líquido ou por congelamento a temperaturas inferiores a -18 °C).

47. Durante a fase de eliminação, os vermes substituem o conteúdo contaminado do trato digestivo por solo limpo. Quer isto dizer que, no caso de animais que não purgaram o trato digestivo (vermes da família *Enchytraeidae*, neste caso) integrantes de amostras colhidas imediatamente antes da fase de eliminação, as medições incluem solo contaminado presente no trato digestivo. Em relação aos oligoquetas aquáticos, considera-se que, após as primeiras 4 a 24 horas da fase de eliminação, a maior parte do conteúdo contaminado do trato digestivo foi substituída por sedimento limpo — p. ex., 46. Observou-se o mesmo em minhocas em estudos sobre a acumulação de cádmio e zinco com marcação radioativa (78). Nos vermes da família *Enchytraeidae*, que não purgaram o trato digestivo, a concentração desta primeira amostra da fase de eliminação pode ser considerada como concentração nos tecidos após purga do trato digestivo. Para atender à diluição da concentração do produto químico em estudo por solo não contaminado, durante a fase de eliminação, a massa do conteúdo do trato digestivo pode ser estimada a partir do quociente entre a massa húmida de vermes e a massa das suas cinzas ou do quociente entre a massa seca de vermes e a massa das suas cinzas.

▼M4

48. As amostras de solo e de vermes devem, de preferência, ser analisadas imediatamente após a remoção (ou seja, no prazo de um a dois dias), a fim de evitar degradações ou outras perdas, e é recomendável calcular as velocidade aproximadas de absorção e de eliminação no decurso do ensaio. Se a análise for adiada, as amostras devem ser armazenadas por um método adequado — por exemplo, ultracongelamento (≤ -18 °C).

49. Deve confirmar-se se a precisão e a reprodutibilidade da análise química, bem como a recuperação do produto químico em estudo das amostras de solo e das amostras de vermes, são satisfatórias para o método em questão. Devem indicar-se a eficácia da extração, o limite de deteção e o limite de quantificação. Do mesmo modo, deve confirmar-se que o produto químico em estudo não é detetável nos recipientes de controlo em concentrações superiores ao nível de fundo. A concentração do produto químico em estudo (C_a), se for > 0 nos vermes de controlo, deve ser incluída no cálculo dos parâmetros cinéticos (cf. apêndice 2). Ao longo de todo o ensaio, as amostras devem ser manipuladas de modo a minimizar contaminações e perdas (resultantes, por exemplo, da adsorção do produto químico em estudo no dispositivo de colheita das amostras).

50. Caso se estude um produto químico com marcação radioativa, é possível analisar o produto químico parental e os seus metabolitos. A determinação quantitativa do produto químico parental e dos seus metabolitos em estado estacionário ou no final da fase de absorção fornece informações importantes. As amostras devem então ser limpas, para que possa determinar-se quantitativamente apenas o produto químico parental. Se a um único metabolito corresponderem mais de 10 % da radioatividade total na(s) amostra(s) analisada(s), é recomendável identificá-lo.

51. Devem ser registadas e indicadas a recuperação global e a recuperação do produto químico nos vermes, no solo e em eventuais armadilhas com absorventes para reter o produto químico evaporado.

52. O agrupamento dos espécimes que constituem a amostra colhida num determinado recipiente de ensaio é aceitável em relação aos vermes da família *Enchytraeidae*, que são menores do que as minhocas. Se o agrupamento implicar a redução do número de replicados, os procedimentos estatísticos aplicáveis aos dados sofrerão limitações. Se forem exigíveis um procedimento estatístico e uma representatividade estatística específicos, deve ser utilizado no ensaio um número de recipientes de replicação adequado ao agrupamento, ao procedimento e à representatividade pretendidos.

53. Recomenda-se que o BAF seja expresso em função da massa seca total e, quando necessário (ou seja, no caso de produtos químicos muito hidrofóbicos), também em função do teor de lípidos. Devem ser utilizados métodos adequados para determinar o teor de lípidos (alguns dos métodos existentes — p. ex., 31 e 58 — têm de ser adaptados para o efeito). Estes métodos recorrem a uma técnica de extração com clorofórmio/metanol. No entanto, para evitar os solventes clorados, deve utilizar-se uma versão modificada do método de Bligh e Dyer (9), descrita na referência (17). Como os vários métodos podem não conduzir a resultados idênticos, importa explicar o método utilizado. Sempre que possível, isto é, quando se dispuser de tecido suficiente, a análise dos lípidos deve, idealmente, ser feita na mesma amostra ou no mesmo extrato que a análise do produto químico em estudo, porquanto os lípidos têm frequentemente de ser removidos do extrato antes de este poder ser analisado cromatograficamente (49). Alternativamente, pode utilizar-se animais de controlo para medir o teor de lípidos, que serve em seguida para normalizar os valores do BAF. Esta última metodologia reduz a contaminação do equipamento com o produto químico em estudo.

▼M4

DADOS E RELATÓRIOS

Tratamento dos resultados

54. A curva de absorção do produto químico em estudo é obtida exprimindo em função do tempo a concentração do produto no interior ou à superfície dos vermes durante a fase de absorção, em escalas aritméticas. Quando a curva atinge um patamar ou estado estacionário (ver definições no apêndice 1), calcula-se o fator de bioacumulação em estado estacionário BAF_{ss} pela seguinte fração:

$$\frac{C_a \text{ em estado estacionário ou no final da fase de absorção (média)}}{C_s \text{ em estado estacionário ou no final da fase de absorção (média)}}$$

C_a Ca é a concentração do produto químico em estudo no organismo sujeito ao ensaio;

C_s é a concentração do produto químico em estudo no solo.

55. Se não for atingido estado estacionário (ou seja, se a curva não atingir um patamar), deve ser determinado o BAF_K, baseado nas constantes de velocidade, em vez do BAF_{ss}, como se segue:

— determina-se o fator de acumulação (BAF_K) como quociente k_s/k_e,

— de preferência, as velocidades de absorção e de eliminação calculam-se simultaneamente (cf. equação 11 no apêndice 2),

— a constante de velocidade de eliminação (k_e) é normalmente determinada a partir da curva de eliminação (ou seja, da linha que representa a concentração do produto químico nos vermes durante a fase de eliminação). A constante de velocidade de absorção (k_s) é então calculada em função de k_e e de um valor de C_a derivado da curva de absorção — ver no apêndice 2 uma descrição destes métodos. Para obter o fator BAF_K e as constantes de velocidade k_s e k_e, é preferível recorrer a métodos informáticos de estimativa de parâmetros não lineares. Se, manifestamente, a curva de eliminação não obedecer a uma cinética de primeira ordem, devem ser utilizados modelos mais complexos.

Relatório dos ensaios

56. Elementos a constar do relatório dos ensaios:

Produto químico em estudo:

— todas as informações disponíveis sobre toxicidade aguda e a longo prazo (p. ex., CE_x, CL_x, NOEC) para oligoquetas que vivem no solo,

— grau de pureza, estado físico e propriedades físico-químicas — p. ex., log K_{ow}, hidrossolubilidade,

— dados de identificação química: proveniência do produto químico em estudo, identidade e concentração dos solventes eventualmente utilizados,

— se o produto químico tiver marcação radioativa, a posição precisa dos átomos marcados, a radioatividade específica e a pureza radioquímica.

Espécies sujeitas ao ensaio:

— denominação científica, estirpe, origem, pré-tratamentos eventuais, aclimatação, idade, gama de dimensões, etc.

▼M4

Condições de realização dos ensaios:

— procedimento de ensaio utilizado,

— tipo e características da iluminação utilizada e fotoperíodo(s),

— protocolo do ensaio (por exemplo, número e tamanho dos recipientes, massa de solo e espessura da camada de solo, número de replicados, número de vermes por replicado, número de concentrações de ensaio, duração da fase de absorção e da fase de eliminação, frequência da colheita de amostras),

— justificação da escolha do material dos recipientes de ensaio,

— método de preparação e aplicação do produto químico em estudo e razões da escolha desse método,

— concentrações de ensaio nominais, bem como as médias e os desvios-padrão dos valores medidos nos recipientes de ensaio e o método de obtenção desses valores,

— origem dos componentes do solo artificial ou — se se utilizar um meio natural — origem do solo, descrição de eventuais pré-tratamentos, resultados dos controlos (sobrevivência, evolução da biomassa, reprodução), características do solo — pH, teor de carbono orgânico total, distribuição granulométrica (percentagem de areia, de limo e de argila), capacidade máxima de retenção de água, teor percentual de água no início e no final do ensaio e quaisquer outras medições efetuadas,

— explicação do tratamento das amostras de solo e de vermes, incluindo elementos sobre a preparação, a armazenagem, os procedimentos de enriquecimento do solo com o produto químico em estudo, a extração, os procedimentos de análise (e sua precisão) do produto químico nos vermes e no solo, o teor de lípidos (se for medido) e as recuperações do produto químico em estudo.

Resultados:

— mortalidade dos vermes de controlo e dos vermes de cada recipiente de ensaio e eventuais comportamentos anormais observados (por exemplo, os vermes evitam o solo, não se verifica a reprodução de vermes da família *Enchytraeidae* num ensaio de bioacumulação, etc.),

— quociente entre massa seca e massa húmida, quer do solo quer dos organismos sujeitos ao ensaio (útil para a normalização),

— massa húmida dos vermes em cada tempo de colheita de amostras; no caso das minhocas, a massa húmida no início do ensaio e em cada tempo de colheita de amostras antes e depois da purga do trato digestivo,

— teor de lípidos dos organismos sujeitos ao ensaio (se for medido),

— curvas indicando a cinética de absorção e de eliminação do produto químico nos vermes e o intervalo de tempo até ao estado estacionário,

— C_a e C_s (com desvio-padrão e intervalo, se for caso disso) para cada tempo de colheita de amostras (C_a expressa em g por kg de massa húmida e de massa seca do corpo inteiro; C_s expressa em g por kg de massa húmida e por kg de massa seca do solo). Se for necessário um fator de acumulação biota-solo (BSAF) (por exemplo, para comparação dos resultados de dois ou mais ensaios realizados em animais com diferentes teores de lípidos), C_a pode também ser expressa em g por kg de lípidos do organismo e C_s pode ser expressa em g por kg de carbono orgânico do solo,

— BAF (expresso em kg de solo por kg de vermes), constante de velocidade de absorção do solo (k_s, expressa em g de solo por kg de vermes por dia) e constante de velocidade de eliminação (k_e, expressa em dia^{-1}); adicionalmente, pode indicar-se o BSAF (expresso em kg de carbono orgânico do solo por kg de lípidos dos vermes),

▼M4

— se tiverem sido medidas: percentagens do produto químico parental, dos metabolitos deste e dos resíduos ligados (ou seja, percentagem do produto químico em estudo que não pode ser extraído por métodos de extração comuns) detetadas no solo e nos animais sujeitos ao ensaio,

— métodos utilizados para as análises estatísticas dos dados.

Avaliação dos resultados:

— coerência dos resultados com os critérios de validade referidos no ponto 17,

— resultados inesperados ou inabituais — por exemplo, eliminação incompleta do produto químico pelos animais sujeitos ao ensaio.

REFERÊNCIAS:

(1) Amorim M. (2000). Chronic and toxicokinetic behavior of Lindane (γ--HCH) in the Enchytraeid *Enchytraeus albidus*. Tese de mestrado, Universidade de Coimbra.

(2) ASTM (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates. American Society for Testing and Materials, E 1688-00a.

(3) ASTM International (2004). Standard guide for conducting laboratory soil toxicity or bioaccumulation tests with the Lumbricid earthworm Eisenia fetida and the Enchytraeid potworm *Enchytraeus albidus*. ASTM International, E1676-04: 26 pp.

(4) Beek B., Boehling S., Bruckmann U., Franke C., Joehncke U., Studinger G. (2000). The assessment of bioaccumulation. *In* Hutzinger, O. (editor), The Handbook of Environmental Chemistry, vol. 2, parte J (editordo volume: B. Beek): Bioaccumulation — New Aspects and Developments. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 235-276.

(5) Belfroid A., Sikkenk M., Seinen W., Van Gestel C., Hermens J. (1994). The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in soil. *Environ. Toxicol. Chem.* 13: 93-99.

(6) Belfroid A., Van Wezel A., Sikkenk M., Van Gestel C., Seinen W. e Hermens J. (1993). The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in water. *Ecotox. Environ. Safety* 25: 154-165.

(7) Belfroid A., Meiling J., Drenth H., Hermens J., Seinen W., Van Gestel C. (1995). Dietary uptake of superlipophilic compounds by earthworms (*Eisenia andrei*). *Ecotox. Environ. Safety* 31: 185-191.

(8) Bell AW (1958). The anatomy of Enchytraeus albidus, with a key to the species of the genus *Enchytraeus*. *Ann. Mus. Novitat.* 1902: 1-13.

(9) Bligh E.G. e Dyer W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. *Biochem. Pysiol.* 37: 911-917.

(10) Bouche M. (1972). Lombriciens de France. Écologie et Systématique. INRA, Annales de Zoologie-Écologie animale, Paris, 671 p.

(11) Bruns E., Egeler Ph., Moser T., Römbke J., Scheffczyk A., Spörlein P. (2001a). Standardisierung und Validierung eines Bioakkumulationstests mit terrestrischen Oligochaeten. Relatório à Agência Federal Alemã do Ambiente (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 298 64 416.

(12) Bruns E., Egeler Ph., Römbke J., Scheffczyk A., Spörlein P. (2001b). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by the oligochaetes *Enchytraeus luxuriosus* and *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae, Oligochaeta, Annelida). *Hydrobiologia* 463: 185-196.

(13) Conder J.M. e Lanno R.P. (2003). Lethal critical body residues as measures of Cd, Pb, and Zn bioavailability and toxicity in the earthworm *Eisenia fetida*. *J. Soils Sediments* 3: 13-20.

▼M4

(14) Connell D.W. e Markwell R.D. (1990). Bioaccumulation in the Soil to Earthworm System. *Chemosphere* 20: 91-100.

(15) Didden W.A.M. (1993). Ecology of Terrestrial Enchytraeidae. *Pedobiologia* 37: 2-29.

(16) Didden W. (2003). Oligochaeta, In: Bioindicators and biomonitors. Markert B.A., Breure A.M. e Zechmeister H.G. (eds.). Elsevier Science Ltd., Países Baixos, p. 555-576.

(17) De Boer J., Smedes F., Wells D., Allan A. (1999). Report on the QUASH interlaboratory study on the determination of total-lipid in fish and shellfish. Round 1 SBT-2, Exercise 1000, EU, Standards, Measurement and Testing Programme.

(18) Dietrich D.R., Schmid P., Zweifel U., Schlatter C., Jenni-Eiermann S., Bachmann H., Bühler U., Zbinden N. (1995). Mortality of birds of prey following field application of granular carbofuran: A Case Study. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 29: 140-145.

(19) Regulamento (CE) n.º 1907/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 18 de dezembro de 2006, relativo ao registo, avaliação, autorização e restrição dos produtos químicos (REACH), que cria a Agência Europeia dos Produtos Químicos, que altera a Directiva 1999/45/CE e que revoga o Regulamento (CEE) n.º 793/93 do Conselho e o Regulamento (CE) n.º 1488/94 da Comissão, bem como a Diretiva 76/769/CEE do Conselho e as Diretivas 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE e 2000/21/CE da Comissão (JO L 396 de 30.12.2006, p. 1).

(20) Edwards C.A. e Bohlen P.J. (1996). Biology and ecology of earthworms. Terceira edição, Chapman & Hall, Londres, 426 pp.

(21) OCDE (2008), Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochaetes, Guideline No 315, Guidelines for the testing of chemicals. OCDE, Paris

(22) Egeler Ph., Gilberg D., Scheffczyk A., Moser Th. e Römbke J. (2009). Validierung einer Methode zur standardisierten Messung der Bioakkumulation mit terrestrischen Oligochaeten. Relatório à Agência Federal Alemã do Ambiente (Umweltbundesamt Dessau-Rosslau), R&D No.: 204 67 458: 149 pp. Disponível em: http://www.oecd.org/dataoecd/12/20/42552727.pdf.

(23) Elmegaard N. e Jagers op Akkerhuis G.A.J.M. (2000). Safety factors in pesticide risk assessment, Differences in species sensitivity and acute-chronic relations. National Environmental Research Institute, NERI Technical Report 325: 57 pp.

(24) Environment Canada (1995). Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. Relatório de série sobre a proteção do ambiente EPS 1/RM/30.

(25) EPPO (2003). Environmental Risk Assessment scheme for plant protection products. Soil organisms and functions, Normas da EPPO (European Plant Protection Organization), Bull, OEPP/EPPO 33: 195-208.

(26) Franke C. (1996). How meaningful is the bioconcentration factor for risk assessment? *Chemosphere* 32: 1897-1905.

(27) Franke C., Studinger G., Berger G., Böhling S., Bruckmann U., Cohors-Fresenborg D., Jöhncke U. (1994). The assessment of bioaccumulation. *Chemosphere* 29: 1501-1514.

(28) Füll C. (1996). Bioakkumulation und Metabolismus von -1,2,3,4,5,6-Hexachlorcyclohexan (Lindan) und 2-(2,4-Dichlorphenoxy)-propionsäure (Dichlorprop) beim Regenwurm *Lumbricus rubellus* (*Oligochaeta*, *Lumbricidae*). Dissertação na Universidade de Mogúncia, 156 pp.

▼M4

(29) Füll C., Schulte C., Kula C. (2003). Bewertung der Auswirkungen von Pflanzenschutzmitteln auf Regenwürmer. UWSF-Z. *Umweltchem, Ökotox.* 15: 78-84.

(30) Gabric A.J., Connell D.W., Bell P.R.F. (1990). A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes. *Wat. Res.* 24: 1225--1231.

(31) Gardner W.S., Frez W.A., Cichocki E.A., Parrish C.C. (1985). Micromethods for lipids in aquatic invertebrates. *Limnology and Oceanography* 30: 1099-1105.

(32) Hawker D.W. e Connell D.W. (1988). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. *Wat. Res.* 22: 701-707.

(33) Hund-Rinke K. e Wiechering H. (2000). Earthworm avoidance test for soil assessments: An alternative for acute and reproduction tests. *J. Soils Sediments* 1: 15-20.

(34) Hund-Rinke K., Römbke J., Riepert F., Achazi R. (2000). Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden mit Hilfe von Regenwurmtests. *In*: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden S., Erb R., Dott W., Eisentraeger A. (eds.), Spektrum Verl., Heidelberga, 59-81.

(35) ISO 11268-2 (1998) Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction.

(36) Jaenike J. (1982). *Eisenia foetida* is two biological species. Megadrilogica 4: 6-8.

(37) Jager T. (1998). Mechanistic approach for estimating bioconcentration of organic chemicals in earthworms (Oligochaeta). *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 2080-2090.

(38) Jager T., Sanchez P.A., Muijs B., van der Welde E., Posthuma L. (2000). Toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons in Eisenia andrei (*Oligochaeta*) using spiked soil. Environ. Toxicol. Chem. 19: 953-961.

(39) Jager T., Baerselman R., Dijkman E., De Groot A.C., Hogendoorn E.A., De Jong A., Kruitbosch J.A.W., Peijnenburg W.J.G. M. (2003a). *Availability of polycyclic aromatic hydrocarbons to earthworms (*Eisenia andrei*,* Oligochaeta) in field-polluted soils and soil-sediment mixtures*. Environ. Toxicol. Chem.* 22: 767-775.

(40) Jager T., Fleuren R.L.J., Hoogendoorn E., de Korte G. (2003b). Elucidating the routes of exposure for organic chemicals in the earthworm, *Eisenia andrei* (*Oligochaeta*). *Environ. Sci. Technol.* 37: 3399-3404.

(41) Janssen M.P.M., Bruins A., De Vries T.H., Van Straalen N.M. (1991). Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 20: 305-312.

(42) Kasprzak K. (1982). Review of enchytraeid community structure and function in agricultural ecosystems. *Pedobiologia* 23: 217-232.

(43) Khalil A.M. (1990). Aufnahme und Metabolismus von ^{14}C-Hexachlorbenzol und ^{14}C-Pentachlornitrobenzol in Regenwürmern. Dissertação na Universidade de Munique, 137 pp.

(44) Landrum P.F. (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi*. *Environ. Sci. Toxicol.* 23: 588-595.

(45) Marinussen M.P.J.C., Van der Zee S.E.A.T.M., De Haan F.A. (1997). Cu accumulation in Lumbricus rubellus under laboratory conditions compared with accumulation under field conditions. *Ecotox. Environ. Safety* 36: 17-26.

(46) Mount D.R., Dawson T.D., Burkhard L.P. (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus* variegates. *Environ. Toxicol. Chem.* 18: 1244-1249.

▼M4

(47) Nendza M. (1991). QSARs of bioaccumulation: Validity assessment of log K_{ow}/log BCF correlations, *In*: R. Nagel e R. Loskill (eds.): Bioaccumulation in aquatic systems, Contributions to the assessment, Proceedings of an international workshop, Berlim 1990, VCH, Weinheim.

(48) Capítulo C.8 deste anexo — *Toxicidade em relação às minhocas*.

(49) Capítulo C.13 deste anexo — *Bioconcentração: ensaio dinâmico com peixe*.

(50) Capítulo C.21 deste anexo — *Microorganismos no solo: ensaio de transformação de azoto*.

(51) OCDE (2004a), Enchytraeid reproduction test, *Test Guideline No 220*, *Guidelines for the testing of chemicals*, OCDE, Paris.

(52) OCDE (2004b), *Earthworm reproduction test (*Eisenia fetida/Eisenia Andrei*)*, *Test Guideline No 222*, *Guidelines for the testing of chemicals*, OCDE, Paris.

(53) OCDE (2008), *Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochates*, *Test Guideline No 315*, *Diretrizes para os ensaios a produtos químicos*, OCDE, Paris.

(54) Petersen H. e Luxton M. (1982). A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. *Oikos* 39: 287-388.

(55) Phillips D.J.H. (1993). Bioaccumulation. *In*: Handbook of Ecotoxicology Vol. 1. Calow P. (ed.). Blackwell Scientific Publ., Oxford. 378-396.

(56) Pflugmacher J. (1992). Struktur-Aktivitätsbestimmungen (QSAR) zwischen der Konzentration von Pflanzenschutzmitteln und dem Octanol-Wasser--Koeffzienten UWSF- Z. Umweltchem. *Ökotox.* 4: 77-81.

(57) Posthuma L., Weltje L., Anton-Sanchez F.A. (1996). Joint toxic effects of cadmium and pyrene on reproduction and growth of the earthworm *Eisenia fetida.* Relatório do RIVM n.º 607506001, Bilthoven.

(58) Randall R.C., Lee II H., Ozretich R.J., Lake J.L., Pruell R.J. (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. *Environ.Toxicol. Chem.* 10: 1431-1436.

(59) Römbke J., Egele P., Füll C. (1998). Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. UBA-Texte 28/98, 84 S.

(60) Römbke J. e Moser Th. (1999). Organisation and performance of an international ring-test for the validation of the Enchytraeid reproduction test. UBA-Texte 4/99: 373 pp.

(61) Römbke J., Riepert F., Achazi R. (2000). Enchytraeen als Testorganismen, In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden S., Erb R., Dott W. e Eisentraeger A. (eds.). Spektrum Verl., Heidelberga. 105-129.

(62) Romijn C.A.F.M., Luttik R., Van De Meent D., Slooff W., Canton J.H. (1993). Presentation of a General Algorithm to Include Effect Assessment on Secondary Poisoning in the Derivation of Environmental Quality Criteria, Part 2: Terrestrial food chains. *Ecotox. Envir. Safety* 27: 107-127.

(63) Sample B.E., Suter D.W., Beauchamp J.J., Efroymson R.A. (1999). Literature-derived bioaccumulation models for earthworms: Development and
validation. *Environ. Toxicol. Chem.* 18: 2110-2120.

(64) Schlosser H.-J. e Riepert F. (1992). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina), Teil 2: Erste Ergebnisse mit Lindan und Kaliumdichromat in subletaler Dosierung. Zool. Beitr. NF 34: 413-433.

(65) Schmelz R. e Collado R. (1999). *Enchytraeus luxuriosus* sp. nov., a new terrestrial oligochaete species (*Enchytraeide*, *Clitellata*, *Annelida*). *Carolinea* 57: 93–100.

▼M4

(66) Sims R.W. e Gerard B.M. (1985). Earthworms, *In*: Kermack D.M. e Barnes R.S.K. (Hrsg.): Synopses of the British Fauna (New Series) No. 31. 171 S. Londres: E. J. Brill/Dr. W. Backhuys.

(67) Sousa J.P., Loureiro S., Pieper S., Frost M., Kratz W., Nogueira A.J.A., Soares A.M.V.M. (2000). Soil and plant diet exposure routes and toxicokinetics of lindane in a terrestrial isopod. *Environ. Toxicol. Chem.* 19: 2557–2563.

(68) Spacie A. e Hamelink J.L. (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. *Environ. Toxicol. Chem. 1*, 309-320.

(69) Stephenson G.L., Kaushik A., Kaushik N.K., Solomon K.R., Steele T., Scroggins R.P. (1998). Use of an avoidance-response test to assess the toxicity of contaminated soils to earthworms. *In*: Advances in earthworm ecotoxicology. S. Sheppard, J. Bembridge, M. Holmstrup, L. Posthuma (eds.). Setac Press, Pensacola, 67-81.

(70) Sterenborg I., Vork N.A., Verkade S.K., Van Gestel C.A.M., Van Straalen N.M. (2003). Dietary zinc reduces uptake but not metallothionein binding and elimination of cadmium in the springtail *Orchesella cincta. Environ. Toxicol. Chemistry* 22: 1167-1171.

(71) UBA (Umweltbundesamt) (1991). Bioakkumulation – Bewertungskonzept und Strategien im Gesetzesvollzug. UBA-Texte 42/91. Berlim.

(72) US EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Segunda edição, EPA 600/R-99/064, US, Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.

(73) Van Brummelen TC e Van Straalen NM (1996). Uptake and elimination of benzo(a)pyrene in the terrestrial isopod *Porcellio scaber*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 31: 277-285.

(74) Van Gestel C.A.M. (1992). The influence of soil characteristics on the toxicity of chemicals for earthworms; a review, *In*: Ecotoxicology of Earthworms (Ed. Becker, H. Edwards, P.J. Greig-Smith, P.W. & Heimbach F.). Intercept Press, Andover (GB).

(75) Van Gestel C.A. e Ma W.-C. (1990). An approach to quantitative structure-activity relationships (QSARs) in earthworm toxicity studies. *Chemosphere* 21: 1023-1033.

(76) Van Straalen N.M., Donker M.H., Vijver M.G., van Gestel C.A.M. (2005). Bioavailability of contaminants estimated from uptake rates into soil invertebrates. Environmental Pollution 136: 409-417.

(77) Venter J.M. e Reinecke A.J. (1988). The life-cycle of the compost-worm *Eisenia fetida* (*Oligochaeta*). *South African J. Zool.* 23: 161-165.

(78) Vijver M.G., Vink J.P.M., Jager T., Wolterbeek H.T., van Straalen N.M., van Gestel C.A.M. (2005). Biphasic elimination and uptake kinetics of Zn and Cd in the earthworm Lumbricus rubellus exposed to contaminated floodplain soil. *Soil Biol, Biochem.* 37: 1843-1851.

(79) Widianarko B. e Van Straalen N.M. (1996). Toxicokinetics-based survival analysis in bioassays using nonpersistent chemicals, *Environ. Toxicol. Chem.* 15: 402-406.

▼M4

Apêndice 1

DEFINIÇÕES

Bioacumulação é o aumento que a concentração do produto químico em estudo sofre no interior ou à superfície de um organismo, relativamente à concentração do mesmo produto no meio circundante. A bioacumulação resulta dos processos de bioconcentração e bioamplificação (cf. *infra)*.

Bioconcentração é o aumento que a concentração do produto químico em estudo sofre no interior ou à superfície de um organismo, em consequência da absorção do produto exclusivamente a partir do meio circundante (ou seja, através da superfície do corpo e através do solo ingerido), relativamente à concentração do mesmo produto no meio circundante.

Bioamplificação é o aumento que a concentração do produto químico em estudo sofre no interior ou à superfície de um organismo, sobretudo em consequência da absorção de alimentos ou presas contaminados, relativamente à concentração do mesmo produto nesses alimentos ou presas. A bioamplificação pode conduzir à transferência do produto químico para as cadeias alimentares, com acumulação.

Eliminação de um produto químico em estudo é a perda desse produto pelos tecidos do organismo sujeito ao ensaio, mediante processos ativos ou passivos, perda essa que ocorre independentemente da presença ou ausência do produto químico no meio circundante.

Fator de bioacumulação (BAF) em qualquer momento da fase de absorção deste ensaio de bioacumulação é o quociente entre a concentração do produto químico no interior ou à superfície do organismo sujeito ao ensaio (C_a — em g por kg de massa seca de verme) e a concentração do produto químico no meio circundante (C_s — em g por kg de massa seca de solo); as unidades em que se exprime o BAF são kg de solo por kg de verme.

Fator de bioacumulação em estado estacionário (BAF_{ss}) é o BAF em estado estacionário, sem variação significativa ao longo de um período prolongado, mantendo-se constante durante esse período a concentração do produto químico no meio circundante (C_s — em g por kg de massa seca de solo).

O **fator de bioacumulação**, quando calculado diretamente pelo quociente entre a constante de velocidade de absorção do solo e a constante de velocidade de eliminação do solo (k_s e k_e — cf. *infra)*, é designado fator de bioacumulação cinético (BAF_K).

Fator de acumulação biota-solo (BSAF) é o quociente entre a concentração do produto químico em estudo no interior ou à superfície do organismo sujeito ao ensaio, normalizada relativamente ao teor de lípidos, e a concentração do mesmo produto químico no solo, normalizada relativamente ao teor de carbono orgânico, em estado estacionário. C_a é então expressa em g por kg de lípidos do organismo e C_s em g por kg de teor orgânico do solo; as unidades em que se exprime o BSAF são kg de carbono orgânico por kg de lípidos.

Patamar ou **estado estacionário** é o equilíbrio entre os processos de absorção e de eliminação que ocorrem simultaneamente durante a fase de exposição. No gráfico do BAF em função do tempo, o estado estacionário é atingido quando a curva se torna uma linha paralela ao eixo do tempo e três cálculos sucessivos do BAF em amostras colhidas com intervalos de, pelo menos, dois dias não diferem mais de 20 % entre si, sem que haja diferenças significativas entre os três períodos de amostragem. No caso de produtos químicos de absorção lenta, são mais adequados intervalos de sete dias (49).

Coeficiente de partição carbono orgânico-água (K_{oc}) é o quociente entre a concentração de um produto químico no interior ou à superfície da fração de carbono orgânico de um solo e a concentração do mesmo produto químico na água, em condições de equilíbrio.

Coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}, por vezes também representado por P_{ow}), é o quociente entre a solubilidade de um produto químico em n-octanol e a solubilidade do mesmo produto químico na água, em condições de equilíbrio. O logaritmo de K_{ow} ($\log K_{ow}$) é utilizado como indicador do potencial de bioacumulação de produtos químicos em organismos aquáticos.

▼M4

Fase de absorção ou **de exposição** é o período durante o qual os organismos sujeitos ao ensaio estão expostos ao produto químico em estudo.

Constante de velocidade de absorção do solo (k_s) é o valor numérico que define o ritmo (ou taxa) de aumento da concentração do produto químico em estudo no interior ou à superfície do organismo sujeito ao ensaio, em resultado da fase de absorção de solo; k_s é expressa em g de solo por kg de verme por dia.

Fase de eliminação é o período, depois de os organismos sujeitos ao ensaio serem transferidos de um meio contaminado para um meio isento do produto químico em estudo, durante o qual é estudada a eliminação (ou perda líquida) do produto químico por esses organismos.

Constante de velocidade de eliminação (k_e) é o valor numérico que define o ritmo (ou taxa) de redução da concentração do produto químico em estudo no interior ou à superfície do organismo sujeito ao ensaio, depois de o organismo sujeito ao ensaio ser transferido de um meio que contém o produto químico para um meio dele isento; k_e é expressa em dia^{-1}.

Produto químico em estudo é qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado este método de ensaio.

▼M4

Apêndice 2

Cálculo dos parâmetros de absorção e de eliminação

O principal parâmetro final de um ensaio de bioacumulação é o fator de bioacumulação — BAF. O BAF pode ser calculado dividindo a concentração no organismo sujeito ao ensaio, C_a, pela concentração no solo, C_s, em estado estacionário. Se não se atingir o estado estacionário durante a fase de absorção, calcula-se o BAF_K a partir das constantes de velocidade, em vez do BAF_{ss}. Deve, porém, indicar-se se o BAF é ou não baseado nas concentrações em estado estacionário.

O meio habitual para obter o fator de bioacumulação cinético (BAF_K), a constante de velocidade de absorção do solo (k_s) e a constante de velocidade de eliminação (k_e) são métodos informáticos de estimativa de parâmetros não lineares — por exemplo, com base nos modelos descritos na referência (68). Dado um conjunto de dados sequenciais de concentração em função do tempo e as equações de modelo:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k}e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{(equação 1)}$$

ou

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(e^{-k}e^{(t-tc)} - e^{-k}e^{t}) \qquad t > t_c \qquad \text{(equação 2)}$$

em que

C_a = concentração do produto químico nos vermes [g por kg de massa húmida ou seca]

k_s = constante de velocidade de absorção nos tecidos [g de solo por kg de verme por dia]

C_s = concentração do produto químico no solo [g por kg de massa húmida ou seca]

k_e = constante de velocidade de eliminação [dia^{-1}]

t_c = tempo decorrido até ao final da fase de absorção,

esses programas informáticos calculam os valores de BAF_K, k_s e k_e.

Se a concentração de fundo nos vermes não expostos — por exemplo, no dia 0 — diferir significativamente de zero (pode, por exemplo, ser o caso relativamente aos metais), essa concentração de fundo ($C_{a,0}$) deve ser incluída nas equações, transformando-as em:

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k}e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{(equação 3)}$$

e

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s(e^{-k}e^{(t-tc)} - e^{-k}e^{t}) \qquad t > t_c \qquad \text{(equação 4)}$$

Nos casos em que, durante a fase de absorção, se observa ao longo do tempo um decréscimo significativo da concentração do produto químico no solo, podem utilizar-se os seguintes modelos — p. ex., 67 e 79:

$$C_s = C_0(e^{-k0^{t}}) \qquad \text{(equação 5)}$$

▼M4

em que

C_s = concentração do produto químico no solo [g por kg de massa húmida ou seca]

k_0 = constante de velocidade de degradação no solo [dia^{-1}]

C_0 = concentração inicial do produto químico no solo [g por kg de massa húmida ou seca]

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times (e^{-k_0 t} - e^{-k} e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{(equação 6)}$$

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times e^{-k_0 tc} - e^{-k} e^{tc} * e^{-k(t-tc)} \qquad t > t_c \qquad \text{(equação 7)}$$

em que

C_a = concentração do produto químico nos vermes [g por kg de massa húmida ou seca]

k_s = constante de velocidade de absorção nos tecidos [g de solo por kg de verme por dia]

k_0 = constante de velocidade de degradação no solo [dia^{-1}]

k_e = constante de velocidade de eliminação [dia^{-1}]

t_c = tempo decorrido até ao final da fase de absorção.

Se durante a fase de absorção for atingido o estado estacionário (ou seja, se $t = \infty$), a equação 1

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k} e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{(equação 1)}$$

pode ser reduzida a:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s$$

ou

$$C_a / C_s = k_s / k_e = BAF_K \qquad \text{(equação 8)}$$

Então k_s/k_e x C_s é uma aproximação à concentração do produto químico nos tecidos dos vermes em estado estacionário ($C_{a,ss}$).

O fator de acumulação biota-solo (BSAF) pode ser calculado pela seguinte fórmula:

$$BSAF = BAF_K * \frac{f_{oc}}{f_{lip}} \qquad \text{(equação 9)}$$

em que f_{oc} é a fração de carbono orgânico do solo e f_{lip} é a fração de lípidos dos vermes, ambas preferencialmente determinadas em amostras colhidas no âmbito do ensaio e baseadas, ambas, na massa seca ou na massa húmida.

As constantes cinéticas de eliminação podem ser modelizadas utilizando os dados da fase de eliminação e aplicando a equação de modelo *infra* e um método informático de estimativa de parâmetros não lineares. Se o gráfico dos dados em função do tempo indicar um decréscimo exponencial constante da concentração do produto químico nos animais, pode utilizar-se um modelo monocompartimental (equação 9) para descrever a eliminação ao longo do tempo.

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k} e^{t} \qquad \text{(equação 10)}$$

▼**M4**

Os processos de eliminação revelam-se por vezes bifásicos, com rápido decréscimo de C_a durante as primeiras fases da eliminação e perda mais lenta do produto químico em estudo nas fases posteriores — p. ex., 27 e 68. As duas fases podem ser interpretadas admitindo que há dois compartimentos distintos no organismo, que eliminam a velocidades diferentes o produto químico em estudo. Nestes casos, deve consultar-se literatura específica — p. ex., 38, 39, 40 e 78.

Por meio das equações de modelo *supra,* os parâmetros cinéticos (k_s e k_e) podem também ser calculados de uma só vez aplicando o modelo de cinética de primeira ordem simultaneamente a todos os dados da fase de absorção e da fase de eliminação. Para a descrição de um método que permita esse cálculo combinado das constantes de velocidade de absorção e de eliminação, consultar, por exemplo, as referências 41, 73 e 70.

$$C_a = \left[\frac{K_s}{K_e} \cdot C_s(1 - e^{-k_e t}) \times (m = 1)\right] + \left[\frac{K_s}{k_e} \times C_s(e^{-K_e(t-t_c)} - e^{-K_e t}) \times (m = 2)\right] \quad \text{(equação 11)}$$

Nota: Se os parâmetros de absorção e de eliminação forem estimados simultaneamente a partir dos dados combinados de absorção e de eliminação, o "m" que aparece na equação 11 é um descritor que permite ao programa informático associar os subtermos da equação aos conjuntos de dados da fase respetiva e efetuar corretamente os cálculos (m = 1 para a fase de absorção, m = 2 para a fase de eliminação).

Estas equações de modelo devem, porém, ser utilizadas com precaução, em especial se, durante o ensaio, ocorrerem alterações da biodisponibilidade ou da (bio)degradação do produto químico em estudo — p. ex., (79).

▼M4

Apêndice 3

EXEMPLOS DE PROGRAMAÇÃO DE ENSAIOS DE BIOACUMULAÇÃO NO SOLO

Ensaio em minhocas

a) Fase de absorção, com oito datas de colheita de amostras para cálculo dos parâmetros cinéticos

Dia	Atividade
– 6	O solo preparado é condicionado durante 48 h;
– 4	A fração de solo é enriquecida com a solução do produto químico em estudo; deixa-se evaporar os solventes; misturam-se os componentes do solo; distribui-se o solo pelos recipientes de ensaio; estabelece-se o equilíbrio com as condições do ensaio durante quatro dias (três semanas no caso de solo enriquecido com metais);
– 3 a – 1	Os organismos que vão ser sujeitos ao ensaio são separados da cultura, para aclimatação; os componentes do solo são preparados e humedecidos;
0	Mede-se a temperatura e o pH do solo; são retiradas amostras de solo dos recipientes enriquecidos e dos controlos do solvente, para determinar a concentração do produto químico em estudo; adiciona-se ração alimentar; as minhocas são pesadas e distribuídas aleatoriamente pelos recipientes de ensaio; separa-se subamostras suficientes de minhocas para determinar os valores analíticos de fundo, a massa húmida, a massa seca e o teor de lípidos; pesa-se todos os recipientes de ensaio, para verificar o teor de humidade do solo; verifica-se a alimentação de ar, se for utilizado um sistema de ensaio fechado;
1	Verifica-se a alimentação de ar e regista-se o comportamento das minhocas e a temperatura; colhe-se amostras do solo e das minhocas para determinar a concentração do produto químico em estudo;
2	O mesmo que no dia 1;
3	Verifica-se a alimentação de ar, o comportamento das minhocas e a temperatura;
4	O mesmo que no dia 1;
5 - 6	O mesmo que no dia 3;
7	O mesmo que no dia 1; adiciona-se ração alimentar; verifica-se o teor de humidade do solo, pesando novamente os recipientes de ensaio; repõe-se a água evaporada;
8 - 9	O mesmo que no dia 3;
10	O mesmo que no dia 1;
11 - 13	O mesmo que no dia 3;
14	O mesmo que no dia 1; adiciona-se ração alimentar; verifica-se o teor de humidade do solo, pesando novamente os recipientes de ensaio; repõe-se a água evaporada;
15 - 16	O mesmo que no dia 3;
17	O mesmo que no dia 1;
18 - 20	O mesmo que no dia 3;

▼**M4**

Dia	Atividade
21	O mesmo que no dia 1; mede-se a temperatura e o pH do solo; verifica-se o teor de humidade do solo, pesando novamente os recipientes de ensaio; termina a fase de absorção; transfere-se as minhocas dos replicados expostos restantes para recipientes contendo solo limpo, com vista à fase de eliminação (sem purga do trato digestivo); colhe-se amostras de solo e de minhocas dos controlos do solvente.
	As atividades de pré-exposição (fase de estabelecimento do equilíbrio) devem ser programadas tendo em conta as propriedades do produto químico em estudo.
	As atividades descritas para o dia 3 devem ser executadas diariamente (pelo menos em dias úteis).

b) Fase de eliminação

Dia	Atividade
– 6	Os componentes do solo são preparados e humedecidos; o solo preparado é condicionado durante 48 h;
– 4	Mistura-se os componentes do solo; distribui-se o solo pelos recipientes de ensaio; incuba-se nas condições de ensaio durante 4 dias;
0 (final da fase de absorção)	Mede-se a temperatura e o pH do solo; as minhocas são pesadas e distribuídas aleatoriamente pelos recipientes de ensaio; adiciona-se ração alimentar; transferem-se as minhocas dos replicados expostos restantes para recipientes contendo solo limpo; colhem-se amostras do solo e das minhocas quatro a seis horas mais tarde, para determinar a concentração do produto químico em estudo;
1	Verifica-se a alimentação de ar e regista-se o comportamento das minhocas e a temperatura; colhe-se amostras do solo e das minhocas para determinar a concentração do produto químico em estudo;
2	O mesmo que no dia 1;
3	Verificam-se a alimentação de ar, o comportamento das minhocas e a temperatura;
4	O mesmo que no dia 1;
5 - 6	O mesmo que no dia 3;
7	O mesmo que no dia 1; adiciona-se ração alimentar; verifica-se o teor de humidade do solo, pesando novamente os recipientes de ensaio; repõe-se a água evaporada;
8 - 9	O mesmo que no dia 3;
10	O mesmo que no dia 1;
11 - 13	O mesmo que no dia 3;
14	O mesmo que no dia 1; adiciona-se ração alimentar; verifica-se o teor de humidade do solo, pesando novamente os recipientes de ensaio e compensando a água evaporada;
15 - 16	O mesmo que no dia 3;
17	O mesmo que no dia 1;

▼M4

Dia	Atividade
18 - 20	O mesmo que no dia 3;
21	O mesmo que no dia 1; mede-se a temperatura e o pH do solo; verifica-se o teor de humidade do solo, pesando novamente os recipientes de ensaio; colhe-se amostras de solo e de minhocas dos controlos do solvente.
	Antes de se iniciar a fase de eliminação, o solo deve ser preparado do mesmo modo que antes de se iniciar a fase de absorção.
	As atividades descritas para o dia 3 devem ser executadas diariamente (pelo menos em dias úteis).

Ensaio em vermes da família *Enchytraeidae*

a) Fase de absorção, com oito datas de colheita de amostras, para cálculo dos parâmetros cinéticos

Dia	Atividade
– 6	O solo preparado é condicionado durante 48 h;
– 4	A fração de solo é enriquecida com a solução do produto químico em estudo; deixa-se evaporar os solventes; mistura-se os componentes do solo; distribui-se o solo pelos recipientes de ensaio; estabelece-se o equilíbrio com as condições do ensaio durante quatro dias (três semanas no caso de solo enriquecido com metais);
– 3 a – 1	Os organismos que vão ser sujeitos ao ensaio são separados da cultura, para aclimatação; prepara-se e humedece-se os componentes do solo;
0	Mede-se a temperatura e o pH do solo; colhe-se amostras de solo dos recipientes enriquecidos e dos controlos do solvente, para determinar a concentração do produto químico em estudo; adiciona-se ração alimentar ao solo; os vermes são pesados e distribuídos aleatoriamente pelos recipientes de ensaio; separa-se subamostras suficientes de vermes para determinar os valores analíticos de fundo, a massa húmida, a massa seca e o teor de lípidos; pesa-se todos os recipientes de ensaio, para verificar o teor de humidade do solo; verifica-se a alimentação de ar, se for utilizado um sistema de ensaio fechado;
1	Verifica-se a alimentação de ar e regista-se o comportamento dos vermes e a temperatura; colhe-se amostras do solo e dos vermes, para determinar a concentração do produto químico em estudo;
2	O mesmo que no dia 1;
3	Verifica-se a alimentação de ar, o comportamento dos vermes e a temperatura;
4	O mesmo que no dia 1;
5 - 6	O mesmo que no dia 3;
7	O mesmo que no dia 1; adiciona-se ração alimentar ao solo; verifica-se o teor de humidade do solo, pesando novamente os recipientes; repõe-se a água evaporada;
9	O mesmo que no dia 1;
10	O mesmo que no dia 3;

▼**M4**

Dia	Atividade
11	O mesmo que no dia 1;
12 - 13	O mesmo que no dia 3;
14	O mesmo que no dia 1; adiciona-se ração alimentar ao solo; mede-se a temperatura e o pH do solo; verifica-se o teor de humidade do solo, pesando novamente os recipientes de ensaio; termina a fase de absorção; transfere-se os vermes dos replicados expostos restantes para recipientes contendo solo limpo, com vista à fase de eliminação (sem purga do trato digestivo); colhe-se amostras de solo e de vermes dos controlos do solvente.
	As atividades de pré-exposição (fase de estabelecimento do equilíbrio) devem ser programadas tendo em conta as propriedades do produto químico em estudo.
	As atividades descritas para o dia 3 devem ser executadas diariamente (pelo menos em dias úteis).

▼M4

Apêndice 4

Solo artificial — recomendações de preparação e armazenagem

Dado que podem não estar disponíveis ao longo de todo o ano solos naturais de uma determinada origem e que a presença de organismos indígenas e de micropoluentes pode influenciar o ensaio, recomenda-se para este um substrato artificial, o solo artificial a que se refere o capítulo C.8 deste anexo — *Toxicidade em relação às minhocas* (48). Várias espécies cobaias podem sobreviver, desenvolver-se e reproduzir-se neste solo, garantindo-se uma estandardização máxima e a comparabilidade intralaboratorial e interlaboratorial das condições de ensaio e de cultura.

Componentes do solo

Turfa:	10 %	Turfa de *Sphagnum*, em conformidade com o *Test Guideline 207* da OCDE (48);
Areia quartzítica:	70 %	Areia quartzítica industrial (seca ao ar); granulometria: mais de 50 % das partículas devem situar-se no intervalo 50-200 μm, mas todas devem ser ≤ 2 mm;
Argila caulinítica:	20 %	Teor de caulinite ≥ 30 %;
Carbonato de cálcio:	≤ 1 %	$CaCO_3$, pulverizado, quimicamente puro.

Opcionalmente, pode reduzir-se o teor de carbono orgânico do solo artificial — por exemplo, baixando o teor de turfa para 4-5 % do solo seco e subindo correspondentemente o teor de areia. Com esta redução do teor de carbono orgânico, podem diminuir-se as possibilidades de adsorção do produto químico em estudo ao solo (carbono orgânico) e pode favorecer-se a disponibilização do produto aos vermes (74). Foi demonstrado que as espécies *Enchytraeus albidus* e *Eisenia fetida* podem cumprir os critérios de validade relativos à reprodução quando sujeitas a ensaio em solos naturais com teor de carbono orgânico inferior — p. ex., 2,7 % (33)(61). A experiência adquirida revela que o mesmo se pode também conseguir em solo artificial com 5 % de turfa.

Preparação

Os componentes secos do solo são misturados cuidadosamente (por exemplo, num misturador laboratorial grande). Esta operação deve ser executada cerca de uma semana antes do início do ensaio. Depois de misturados, os componentes secos devem ser humedecidos com água desionizada pelo menos 48 horas antes da aplicação do produto químico em estudo, a fim de equilibrar ou estabilizar a acidez. Para determinar o pH, utiliza-se uma mistura 1:5 de solo com uma solução 1 M de KCl. Se o valor do pH não estiver dentro do intervalo requerido (6,0 ± 0,5), adiciona-se ao solo uma quantidade suficiente de $CaCO_3$ ou prepara-se um novo lote de solo.

A capacidade máxima de retenção de água do solo artificial é determinada de acordo com a norma ISO 11268-2 (35). Pelo menos dois dias antes do início do ensaio, o solo artificial seco é humedecido, adicionando água desionizada ou reconstituída até se obter aproximadamente metade do teor final de água. O teor final de água deve situar-se entre 40 % e 60 % da capacidade máxima de retenção de água. No início do ensaio, o solo previamente humedecido é dividido em tantos lotes quantas as concentrações e os controlos utilizados no ensaio, e o teor de humidade é ajustado para 40 % a 60 % da capacidade máxima de retenção de água com a solução do produto químico em estudo e/ou adicionando água desionizada ou reconstituída. O teor de humidade é determinado no início e no final do ensaio (a 105 °C). Deve ser o teor ótimo para a espécie sujeita ao ensaio (o teor de humidade pode também ser verificado do seguinte modo: espremendo o solo delicadamente na mão, devem aparecer pequenas gotas de água entre os dedos).

▼**M4**

Armazenagem

Os componentes secos do solo artificial podem ser armazenados à temperatura ambiente do laboratório até à sua utilização. O solo preparado e previamente humedecido pode ser armazenado em local fresco até três dias antes do seu enriquecimento; deve minimizar-se a evaporação de água. O solo enriquecido com o produto químico em estudo deve ser utilizado de imediato, a menos que haja indicações de que o solo em questão pode ser armazenado sem afetar a toxicidade e a biodisponibilidade do produto químico em causa. Podem então ser armazenadas amostras do solo enriquecido, respeitando as condições recomendadas para o produto químico em estudo, até à realização das análises.

▼M4

Apêndice 5

Espécies de oligoquetas terrestres recomendadas para ensaios de bioacumulação no solo

Minhocas

A espécie recomendada para os ensaios é a *Eisenia fetida* (Savigny 1826), pertencente à família *Lumbricidae* e dividida desde 1972 em duas subespécies — *Eisenia fetida* e *Eisenia andrei* (10). Segundo Jaenike (36), trata-se de duas espécies separadas. A *Eisenia fetida* é facilmente identificável pelas listras amarelas brilhantes intersegmentais, ao passo que a *Eisenia andrei* tem cor vermelha escura uniforme. Originárias provavelmente da região do Mar Negro, estão hoje distribuídas por todo o mundo, sobretudo em *habitats* antropogenicamente modificados, como as montureiras de compostagem. Ambas podem ser utilizadas para ensaios ecotoxicológicos e de bioacumulação.

A *Eisenia fetida* e a *E. andrei* são comercializadas, por exemplo, como isco para pesca. Em comparação com outros vermes da família *Lumbricidae*, têm um ciclo de vida curto, atingindo a maturidade por volta dos 2 ou 3 meses (à temperatura ambiente do laboratório). A temperatura ótima para elas é de 20 a 24 °C. Preferem substratos relativamente húmidos, com pH próximo da neutralidade e teor elevado de matéria orgânica. Como estas espécies têm sido amplamente utilizadas em ensaios ecotoxicológicos estandardizados desde há uns 25 anos, a sua criação em cultura está bem estabelecida (48)(77).

Ambas as espécies podem ser cultivadas numa ampla gama de resíduos de origem animal. O meio de cultura recomendado pela ISO é uma mistura 50:50 de esterco de cavalo ou de bovino com turfa (35). O meio deve ter um pH de 6 a 7 (regulado com carbonato de cálcio) e baixa condutividade iónica (menos de 6 mS/cm ou menos de 0,5 % de concentração salina) e não deve estar excessivamente contaminado com amoníaco ou urina. Pode também ser utilizado um solo comercial para jardinagem, sem aditivos, solo artificial correspondente à norma da OCDE (48) ou uma mistura 50:50 de ambos. O substrato deve estar húmido, mas não encharcado. São adequadas caixas de cultura de 10 a 50 litros.

Para obter minhocas de idade e massa normalizadas, é melhor iniciar a cultura com casulos de ovos. Por conseguinte, junta-se minhocas adultas a uma caixa de cultura com substrato fresco, para produzir casulos. A experiência demonstra que uma densidade populacional próxima dos 100 vermes adultos por kg de substrato (massa húmida) conduz a boas taxas de reprodução. Ao cabo de 28 dias, retira-se as minhocas adultas. Os vermes provenientes da eclosão dos ovos são utilizados nos ensaios quando atingem a maturidade, ou seja, a partir dos dois meses de idade, mas não ultrapassando os 12 meses.

Os vermes destas duas espécies podem ser considerados saudáveis se se movimentarem através do substrato, não tentarem abandoná-lo e se reproduzirem continuamente. Movimentos muito lentos ou um posterior de cor amarelada (no caso da *Eisenia fetida*) indicam exaustão do substrato. Nesse caso, recomenda-se substrato fresco e/ou um número mais reduzido de animais por caixa.

Referências selecionadas adicionais

Gerard B.M. (1964). Synopsis of the British fauna. No. 6 *Lumbricidae*. Linnean Soc. London, 6: 1-58.

Graff O. (1953). Die Regenwürmer Deutschlands. Schr. Forsch. Anst. Landwirtsch. 7: 1-81.

Römbke J., Egeler P., Füll C. (1997). Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. Bericht für das UBA F + E 206 03 909, 86 S.

Rundgren S. (1977). Seasonality of emergence in lumbricids in southern Sweden. *Oikos* 28: 49-55.

Satchell J.E. (1955). Some aspects of earthworm ecology. *Soil Zoology* (Kevan): 180-201.

▼M4

Sims R.W. e Gerard B.M. (1985). A synopsis of the earthworms. *Linnean Soc. London* 31: 1-171.

Tomlin A.D. (1984). The earthworm bait market in North America. *In*: Earthworm Ecology - from Darwin to vermiculture. Satchell J.E. (ed.), Chapman & Hall, Londres. 331-338 pp.

Vermes da família *Enchytraeidae*

A espécie recomendada para os ensaios é a *Enchytraeus albidus* (Henle 1837), uma das maiores da família *Enchytraeidae* de anelídeos oligoquetas (pode atingir 15 mm) e com distribuição mundial — p. ex., 8. A *Enchytraeus albidus* encontra-se em *habitats* marinhos, limosos ou terrestres, sobretudo em matéria orgânica em decomposição (algas, produtos de compostagem) e raramente em prados (42). Esta ampla tolerância ecológica e algumas variações morfológicas indicam que poderá haver diversas raças ou subespécies.

A *Enchytraeus albidus* é comercializada como alimento para peixes. Deve verificar-se se a cultura está contaminada por outras espécies, normalmente menores (60). Se houver contaminação, lavam-se todos os vermes numa placa de Petri e selecionam-se em seguida, por meio de um estereomicroscópio, grandes espécimes adultos de *Enchytraeus albidus*, para iniciar uma nova cultura. Rejeitam-se todos os restantes indivíduos. O ciclo de vida da espécie é curto, pois a maturidade é atingida entre os 33 dias (a 18 °C) e os 74 dias (a 12 °C). Somente culturas mantidas no laboratório sem problemas durante pelo menos cinco semanas (uma geração) devem ser utilizadas nos ensaios.

Há outras espécies do género *Enchytraeus* igualmente adequadas, com destaque para a *Enchytraeus luxuriosus,* que tem o seu *habitat* verdadeiramente no solo e que foi descrita pela primeira vez na referência (65). Se forem utilizadas outras espécies de *Enchytraeus*, importa identificá-las claramente e justificar a seleção.

A *Enchytraeus crypticus* (Westheide & Graefe 1992) é uma espécie pertencente ao mesmo grupo da *Enchytraeus luxuriosus*. Não está provado que ocorra no campo, tendo sido descrita apenas em culturas de minhocas e montureiras de compostagem (Römbke 2003). Por conseguinte, desconhece-se as suas exigências ecológicas originais. Contudo, estudos laboratoriais recentes em vários solos naturais confirmaram que esta espécie tem uma tolerância ampla em relação a propriedades do solo como o pH e a textura (Jänsch *et al.* 2005). Em anos recentes, foi frequentemente utilizada em estudos ecotoxicológicos, dada a simplicidade da sua criação e da sua sujeição a ensaio (p. ex., Kuperman *et al.* 2003). É, porém, pequena (3-12 mm, com 7 mm em média — Westheide e Müller 1996), o que dificulta a sua manipulação, a comparar com a *Enchytraeus albidus*. Se esta espécie for utilizada em vez da *Enchytraeus albidus*, o recipiente de ensaio pode ser menor. Por outro lado, deve ter-se em conta que esta espécie se reproduz muito rapidamente, tendo um período de geração inferior a 20 dias a 20 ± 2 °C (Achazi *et al.* 1999) ou mesmo mais curto se a temperatura for mais elevada.

Os vermes da espécie *Enchytraeus albidus* (bem como de outras espécies congéneres) podem ser criados em grandes caixas de plástico (por exemplo, de 30 × 60 × 10 cm ou de 20 × 12 × 8 cm, as dimensões adequadas para a cultura de vermes de pequeno tamanho), cheias com uma mistura de solo artificial e de solo para jardinagem, não contaminado e sem aditivos. O material de compostagem deve ser evitado, pois pode conter produtos químicos tóxicos, como metais pesados. Antes da utilização, deve remover-se qualquer fauna do solo de cultura, mediante três ciclos de ultracongelamento. Pode também utilizar-se solo artificial puro, mas a taxa de reprodução poderá ser mais lenta, em comparação com a obtida com substratos mistos. O substrato deve ter um pH de 6,0 ± 0,5. A cultura é mantida numa incubadora à temperatura de 15 ± 2 °C, sem luz. Devem evitar-se sempre temperaturas superiores a 23 °C. O solo, artificial ou natural, deve estar húmido, mas não encharcado. Pressionando o solo suavemente com a mão, devem aparecer apenas gotículas de água. Devem evitar-se sempre condições anóxicas (por exemplo, se se utilizar uma tampa, esta deve ter orifícios em número suficiente para uma boa renovação do ar). Deve arejar-se o solo da cultura, mexendo-o cuidadosamente uma vez por semana.

▼M4

Os vermes devem ser alimentados pelo menos uma vez por semana, *ad libitum*, com flocos de aveia, que se colocam numa cavidade da superfície e se cobrem em seguida com solo. Se no recipiente restar alimento da última ministração, a quantidade distribuída deve ser ajustada em conformidade. Se se tiverem desenvolvido fungos, o alimento restante deve ser substituído por uma nova porção de flocos. A fim de estimular a reprodução, a aveia pode ser complementada, de duas em duas semanas, com proteínas em pó enriquecidas com vitaminas (à venda no comércio). Ao cabo de três meses, os animais são transferidos para uma cultura ou um substrato de reprodução, recentemente preparados. Os flocos de aveia, que têm de ser guardados em recipientes herméticos, devem ser tratados em autoclave ou aquecidos antes da sua ministração, para evitar infeções por ácaros — p. ex., *Glyzyphagus* sp., Astigmata, Acarina, ou *Hypoaspis (Cosmolaelaps) miles*, Gamasida, Acarina. Após a desinfeção, os flocos são moídos, para poderem ser facilmente espalhados na superfície do solo. Uma outra fonte possível de alimento é o fermento de padaria ou a comida para peixes TetraMin®.

Em geral, as condições de cultura são satisfatórias se os vermes não tentarem abandonar o substrato, se movimentarem rapidamente através do solo, exibirem uma superfície externa brilhante, sem partículas de solo pegadas, e tiverem uma coloração mais ou menos esbranquiçada e se forem visíveis vermes de diferentes idades. Na verdade, os vermes podem ser considerados saudáveis se se reproduzirem continuamente.

Referências selecionadas adicionais

Achazi R.K., Fröhlich E., Henneken M., Pilz C. (1999). The effect of soil from former irrigation fields and of sewage sludge on dispersal activity and colonizing success of the annelid *Enchytraeus crypticus* (*Enchytraeidae*, *Oligochaeta*). Newsletter on *Enchytraeidae* 6: 117-126.

Jänsch S., Amorim M.J.B., Römbke J. (2005). Identification of the ecological requirements of important terrestrial ecotoxicological test species. *Environ. Reviews* 13: 51-83.

Kuperman R.G., Checkai R.T., Simini M., Phillips C.T., Kolakowski J.E., Kurnas C.W., Sunahara G.I. (2003). Survival and reproduction of *Enchytraeus crypticus* (*Oligochaeta*, *Enchytraeidae*) in a natural sandy loam soil amended with the nitro-heterocyclic explosives RDX and HMX. *Pedobiologia* 47: 651-656.

Römbke J. (2003). Ecotoxicological laboratory tests with enchytraeids: A review. *Pedobiologia* 47: 607-616.

Westheide W. e Graefe U. (1992). Two new terrestrial Enchytraeus species (*Oligochaeta*, *Annelida*). *J. Nat. Hist.* 26: 479-488.

Westheide W. e Müller M.C. (1996). Cinematographic documentation of enchytraeid morphology and reproductive biology. *Hydrobiologia* 334: 263-267.

▼M6

C.31. ENSAIO COM PLANTAS TERRESTRES: PROTOCOLO PARA O DESENVOLVIMENTO DE PLÂNTULAS A PARTIR DE SEMENTES

INTRODUÇÃO

1. O presente protocolo é equivalente ao *Test Guideline* (TG) 208 (2006) da OCDE. Os protocolos são periodicamente revistos à luz dos últimos progressos científicos e dos resultados obtidos na aplicação de protocolos anteriores. Este melhoramento considera os potenciais efeitos da adição de produtos químicos na germinação de sementes e no desenvolvimento de plântulas. Como tal, não tem em conta os efeitos crónicos ou os efeitos na reprodução (isto é, a produção de sementes, a formação de flores, a maturação dos frutos). É necessário ter em conta a exposição ao produto químico e as propriedades deste, de modo a assegurar que o método prático escolhido é o mais adequado (por exemplo, quando se utilizam metais/compostos de metais deve ponderar-se o efeitos do pH, bem como da carga iónica associada) (1). O protocolo não é aplicável a plantas expostas a produtos químicos vaporizados. Aplica-se à generalidade dos produtos químicos, biocidas e produtos para a proteção de culturas para a alimentação (conhecidos, também, por pesticidas). Foi desenvolvido com base em protocolos já estabelecidos (2) (3) (4) (5) (6) (7), tendo sido tomadas em conta outras referências pertinentes para ensaios com plantas (8) (9) (10). As definições utilizadas figuram no apêndice 1.

PRINCÍPIO DO ENSAIO

2. O presente protocolo avalia os efeitos no desenvolvimento das plântulas e nos primeiros estádios de crescimento das plantas superiores quando expostas ao produto químico em estudo no solo (ou qualquer outra matriz). As sementes são colocadas em contacto com o solo impregnado com o produto químico, sendo avaliados os efeitos deste durante 14 a 21 dias após a germinação de 50 % das sementes no solo-controlo. Os parâmetros determinados são a germinação observada visualmente, o peso seco dos rebentos (ou, em alternativa, o peso fresco dos rebentos) e, em alguns casos, o comprimento dos rebentos, bem como os efeitos nefastos nocivos observados visualmente nas diversas partes da planta. Estas medições e observações são depois comparadas com o solo-controlo.

3. Consoante a via de exposição escolhida, o produto químico pode ser incorporado no solo (ou, eventualmente, numa matriz de solo artificial) ou aplicado à superfície, a qual representa efetivamente a via de exposição ao produto. A incorporação no solo é realizada em bloco. Depois da aplicação, o solo é colocado em vasos e as sementes da espécie estudada são semeadas. A aplicação do produto químico é realizada à superfície do solo, após a introdução das sementes. As unidades de ensaio (controlos e solos impregnados, com as sementes) são depois colocadas em condições adequadas à germinação ou ao crescimento das plantas.

4. O protocolo pode ser utilizado para determinar a resposta ao longo do tempo a uma determinada dosagem ou a uma única concentração/dose como limite de tolerância, em função do objetivo do estudo. Se os resultados obtidos a partir de uma única concentração/dose excederem um certo nível de toxicidade (ou seja, se os efeitos observados forem superiores a uma determinada percentagem), é realizado um teste rápido para determinar os limites superiores e inferiores de toxicidade e, em seguida, é realizado um ensaio de determinação da gama de concentrações de modo a determinar a resposta à dosagem. Recorre-se a uma análise estatística apropriada para obter a concentração ECx ou a dose com efeitos, EDx (EC_{25}, ED_{25}, EC_{50}, ED_{50}). A concentração sem efeitos observáveis (NOEC) e a menor concentração com efeito (LOEC) podem igualmente ser determinadas com este ensaio.

INFORMAÇÕES SOBRE O PRODUTO QUÍMICO EM ESTUDO

5. As informações que se seguem são úteis na identificação da via de exposição esperada para o produto químico em estudo, devendo ser tomadas em conta para estabelecer o protocolo: fórmula estrutural, pureza, solubilidade em

▼M6

água, solubilidade em solventes orgânicos, coeficiente de partição 1-octanol/ /água, comportamento da absorção do solo, pressão de vapor de água, estabilidade química em água e à luz e biodegradação.

VALIDAÇÃO DO ENSAIO

6. Para que o protocolo seja considerado válido, o solo-controlo deverá satisfazer os seguintes critérios:

— a emergência das sementes tem de ser na ordem dos 70 %;

— as plântulas não podem exibir efeitos tóxicos visíveis (ou seja, clorose, necrose, murchidão e alterações morfológicas nas folhas e nos pecíolos). As plantas só devem apresentar variações normais de crescimento e de morfologia, no contexto da espécie em causa;

— as plântulas têm de apresentar, em média, pelo menos, 90 % de taxa de sobrevivência durante o estudo em questão;

— as condições ambientais para uma dada espécie têm de ser idênticas e os meios de cultura experimentados devem ter quantidades iguais de solo, de meio de cultura ou de substrato a partir da mesma fonte.

PRODUTO QUÍMICO DE REFERÊNCIA

7. O produto químico de referência deve ser experimentado a intervalos regulares, para avaliar a validade do protocolo e a resposta das plantas em estudo, bem como para verificar que as condições experimentais não se alteraram significativamente ao longo do tempo. Em alternativa, podem ser utilizados dados de crescimento e medidas de biomassa do controlo obtidos por pesquisa bibliográfica para avaliar a validade do protocolo, que podem também ser utilizados como medida de controlo de qualidade no próprio laboratório onde se realiza o estudo.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Solo natural — Substrato artificial

8. As plantas podem crescer em vasos utilizando um solo limoso-arenoso, arenoso-limoso ou limoso-arenoso-argiloso que contenha até 1,5 % de carbono orgânico (aproximadamente 3 % da matéria orgânica). Pode utilizar-se um solo comercial ou misturas de solo sintéticas que contenham até 1,5 % de carbono orgânico. Não devem ser utilizados solos argilosos se o produto químico em estudo tiver uma elevada afinidade para as argilas. O solo natural deve ser crivado até se obterem partículas de 2 mm, com vista a uniformizá-lo e remover as partículas de maiores dimensões (> 2 mm). Devem registar-se as características do solo final no que se refere ao seu tipo e textura, à percentagem de carbono orgânico, ao pH e ao teor de sais como medida da condutividade. O solo deve ser classificado de acordo com a classificação geral de solos (11). Pode ser pasteurizado ou esterilizado por calor para reduzir o efeito de eventuais agentes patogénicos presentes.

9. A utilização de solo natural pode dificultar a interpretação dos resultados e aumentar a variabilidade devido à alteração das propriedades físico-químicas e das populações microbianas. Estas variáveis alteram a capacidade de retenção da água, a capacidade de troca iónica, o arejamento e o teor de nutrientes e de elementos vestigiais. Para além da variação destes fatores físicos, haverá também alterações das propriedades químicas como o pH e o potencial redox, o qual pode afetar a biodisponibilidade do produto químico experimentado (12) (13) (14).

10. Em geral, os substratos artificiais não são utilizados no ensaio de produtos para proteção de plantas cultivadas, mas podem ser utilizados para testar produtos químicos em geral ou quando se pretende minimizar a variabilidade de solos naturais e aumentar a reprodutibilidade dos resultados. Os substratos utilizados devem ser constituídos por materiais inertes que minimizem a interação com o produto químico experimentado, o solvente utilizado ou ambos. As partículas de areia de quartzo lavadas com ácido, a lã

▼M6

mineral e as esferas de vidro (0,35 a 0,85 mm de diâmetro) são consideradas materiais inertes que minimizam a absorção do produto químico (15), assegurando a total disponibilidade deste para ser absorvido pela raiz e participar no desenvolvimento das plântulas. Os substratos indesejáveis incluem a vermiculite, a pertite ou outros materiais muito absorventes. Os nutrientes para o crescimento das plantas devem ser adicionados de modo a evitar o *stress* das plantas devido a deficiências nutricionais, o que se pode verificar por análise química ou pelo comportamento das plantas do controlo.

Critérios de seleção das espécies

11. As espécies selecionadas devem escolhidas aleatoriamente, isto é, tendo em conta a sua diversidade taxonómica no reino vegetal, a sua distribuição, abundância, características específicas do ciclo de vida e a região da sua ocorrência natural (8) (10) (16) (17) (18) (19) (20). Na seleção das espécies, há que atender às seguintes características:

— as espécies devem ter sementes uniformes que estejam disponíveis a partir de uma fonte de sementes credível e que tenham um comportamento consistente, fiável, possam germinar e apresentem um crescimento consistente das plântulas;

— a planta em estudo deve poder ser testada em laboratório e oferecer resultados fiáveis e reprodutíveis durante as condições experimentais;

— a sensibilidade da espécie em estudo ao produto químico deve ser compatível com as respostas das plantas dadas na natureza;

— as espécies devem ter sido utilizadas regularmente em protocolos de toxicidade e utilizadas para isso mesmo — por exemplo, para ensaios com herbicidas, estudos com metais pesados, estudos de salinidade ou de *stress* com minerais ou estudos de alelopatia que indiquem possuírem sensibilidade para uma gama alargada de elementos de *stress*;

— as espécies têm de ser compatíveis com as condições de crescimento experimentadas;

— as espécies têm de satisfazer os critérios de validação do protocolo.

O apêndice 2 lista as espécies mais utilizadas neste protocolo; o apêndice 3 listada as espécies não cultivadas.

12. O número de espécies a testar é dependente das condições requeridas e, por isso, não é específico do presente protocolo.

Aplicação do produto químico em estudo

13. O produto químico deve ser dissolvido no solvente adequado (por exemplo, água, acetona, etanol, polietilenoglicol, goma arábica, areia). Podem também utilizar-se misturas (compostos ou fórmulas conhecidas) que contenham outros elementos e alguns coadjuvantes.

Incorporação no solo ou num substrato artificial

14. Os produtos químicos solúveis em água podem ser dissolvidos nesta; a solução final é misturada com o solo por meio de um misturador. Este tipo de protocolo é, em geral, adequado quando a exposição ao produto químico se faz através do solo ou de solo poroso e isso é importante para a absorção pela raiz. A capacidade de absorção do solo não deve ser excedida ao adicionar-se o produto químico. O volume de água adicionado deve ser igual para todos os tratamentos, mas deve ser limitado de forma a evitar a formação de aglomerados no solo.

▼M6

15. Os produtos químicos com baixa solubilidade na água devem ser dissolvidos num solvente volátil adequado (por exemplo, acetona, etanol) e misturados com areia. O solvente pode depois ser removido borbulhando ar enquanto se remexe a areia. A areia tratada é misturada com o solo a utilizar. É necessário um segundo controlo que contenha apenas areia e solvente. São adicionadas quantidades iguais de areia, com ou sem solvente, a todos os tratamentos e ao segundo controlo. No caso de produtos químicos sólidos e insolúveis, o solo seco e o produto químico são misturados num misturador. Em seguida, o solo é colocado nos vasos e as sementes semeadas imediatamente.

16. Quando é utilizado um substrato artificial em vez de solo, os produtos químicos solúveis em água devem ser adicionados à solução de nutrientes antes do início do ensaio. Os produtos químicos insolúveis em água, mas que podem ficar em suspensão por recurso a um solvente apropriado, devem ser adicionados com este à solução de nutrientes. Os produtos químicos insolúveis em água para os quais não existe um solvente não tóxico solúvel em água, devem ser dissolvidos no solvente orgânico apropriado. A solução é misturada com areia ou esferas de vidro, colocada num aparelho de vácuo e evaporada, deixando um revestimento na areia ou nas esferas. Uma porção conhecida de esferas deve ser retirada com o mesmo solvente orgânico e o produto químico analisado antes de serem colocadas nos vasos.

Aplicação à superfície

17. Para a generalidade dos produtos para proteção de plantas cultivadas, o método que consiste em espalhar a solução na superfície do solo é comumente utilizado em tratamentos químicos. Todos os equipamentos utilizados no ensaio, incluindo os equipamentos utilizados na preparação e adição do produto químico, devem ser preparados e concebidos de forma a assegurar a reprodutibilidade efetiva do ensaio. A cobertura deve ser uniforme ao longo de toda a superfície. Devem tomar-se cuidados para evitar que o produto químico fique retido ou reaja com o equipamento utilizado (p. ex., vasos de plástico e produtos químicos lipófilos ou materiais inox). O produto químico é espalhado à superfície do solo de forma a simular a aplicação por pulverização. Geralmente, o volume aplicado deve ser o que se utiliza na agricultura, devendo ficar registado em pormenor (quantidade de água, etc.). Devem utilizar-se terminações em bico para assegurar a cobertura uniforme de toda a superfície. Se forem utilizados solventes e transportadores, deve preparar-se um segundo grupo de controlos, nos quais só é aplicado o solvente ou transportador. Tal não é necessário para a generalidade dos produtos para proteção de plantas cultivadas experimentados como formulações.

Verificação da concentração ou dose de produto químico a aplicar

18. As concentrações/doses de aplicação devem ser confirmadas por uma análise adequada. No que respeita aos produtos químicos solúveis em água, a verificação de todas as concentrações/doses experimentadas pode ser confirmada pela análise da solução com a concentração mais elevada utilizada durante o ensaio, tendo em conta as diluições utilizadas e o eventual recurso a equipamentos de aplicação calibrados (material de vidro e outros equipamentos calibrados). No caso dos produtos químicos insolúveis, a verificação pode ser assegurada pelo peso do produto adicionado ao solo. Se for pedida a homogeneização do solo utilizado, pode ser necessária uma análise do solo.

PROCEDIMENTO

Planeamento do ensaio

19. As sementes de uma dada espécie são colocadas nos vasos. O número de sementes semeadas por vaso depende da espécie, das dimensões do vaso e da duração do ensaio. O número de plantas por vaso deve proporcionar o crescimento normal das mesmas nas condições experimentais utilizadas e

▼M6

evitar a sobrelotação no período experimental. O máximo de sementes por vaso deve ser de 3-10 por 100 cm^2, em função do tamanho das mesmas. Como exemplo, uma a duas sementes de milho, soja, tomate, pepino ou beterraba por cada 15 cm; 3 plantas de ervilha ou de colza por cada 15 cm e 5 a 10 de cebola, trigo ou outras sementes pequenas por cada 15 cm, é o recomendado. O número de sementes e de replicados (o replicado é definido como um vaso, pelo que as plantas colocadas no mesmo vaso não são consideradas replicados) deve ser adequado à análise estatística (21). A variabilidade é maior para as espécies que apresentem sementes maiores por vaso (replicado), quando comparada com as espécies com sementes mais pequenas e, por isso, apresentem mais sementes por vaso. Esta variabilidade pode ser minimizada colocando o mesmo número de sementes em cada vaso.

20. Recorre-se aos controlos para estabelecer se os efeitos observados estão associados, única e exclusivamente, ao produto químico em estudo. Os controlos devem ser exatamente iguais aos vasos experimentais, exceto no que se refere à presença do produto químico em estudo. Para um dado protocolo, todas as plantas experimentadas — inclusive os controlos — devem ter a mesma origem. Para evitar resultados tendenciosos, é necessária uma distribuição aleatória de todos os vasos, inclusive dos controlos.

21. Deve evitar-se a utilização de sementes tratadas (revestidas por um inseticida ou fungicida). No entanto, algumas autoridades reguladoras permitem a utilização de certos fungicidas não-sistémicos, como, p. ex., a captana e o tirame (22). Se as sementes apresentarem agentes patogénicos, devem ser lavadas com uma solução diluída de hipoclorito de sódio a 5 % e, depois, abundantemente, com água corrente, e secas. Não é permitido qualquer tratamento com outro produto para proteção de plantas cultivadas.

Condições experimentais

22. As condições experimentais devem ser próximas das condições necessárias ao bom crescimento das espécies e variedades experimentadas (o apêndice 4 apresenta exemplos destas condições). As plantas devem ser mantidas em boas condições de horticultura, em câmaras com condições controladas, fitoclimas ou estufas. Esta prática inclui, geralmente, o controlo diário das condições programadas, o registo da temperatura, humidade, a concentração de dióxido de carbono, a luz (intensidade, comprimento de onda, radiação fotossinteticamente ativa), o fotoperíodo, etc., de forma a assegurar um bom crescimento das plantas, comprovado pelo crescimento observado nas plantas do controlo. As temperaturas nas estufas devem ser controladas por ventilação, aquecimento ou sistemas de arrefecimento. As seguintes condições são geralmente recomendadas para ensaios em estufas:

— temperatura: 22 °C ± 10 °C;

— humidade: 70 % ± 25 %;

— fotoperíodo: mínimo 16 horas de luz;

— intensidade luminosa: 350 ± 50 µE/m2/s. Será necessária iluminação adicional se a intensidade luminosa descer abaixo dos 200 $\mu E/m^2/s$, o comprimento de onda deve estar entre os 400-700 nm, exceto para certas espécies cujas necessidades são menores.

As condições ambientais devem ser monitorizadas e registadas durante todo o estudo. As plantas devem crescer em vasos de plástico que não sejam porosos, com um prato por baixo. Os vasos devem ser reposicionados periodicamente

▼M6

para minimizar a variabilidade no crescimento das plantas (devido às diferenças nas condições experimentais no respeitante ao crescimento). Os vasos devem ser grandes, com dimensões suficientes para permitir um crescimento normal.

23. Podem ser adicionados nutrientes ao solo de forma a manter um bom crescimento. A necessidade e o momento da adição dos nutrientes devem ser avaliados pela observação das plantas do controlo. Recomenda-se regar a base dos vasos (por exemplo, utilizando fibra de vidro). No entanto, pode efetuar-se uma lavagem inicial para estimular a germinação das sementes, e quando o produto químico for aplicado à superfície do solo, para facilitar a sua absorção.

24. As condições de crescimento devem ser específicas das espécies em estudo e do produto químico. O controlo e as plantas tratadas devem ser mantidos nas mesmas condições ambientais; contudo, devem tomar-se medidas para evitar interferências (p. ex., por meio dos compostos voláteis) entre os diferentes tratamentos e o controlo.

Ensaio com uma única concentração/dose

25. De forma a determinar as concentrações adequadas do produto químico para realizar um teste com uma única concentração ou dose (limite de dosagem), importa ter em conta um certo número de fatores. Para a maioria parte dos produtos químicos, esses fatores incluem as propriedades físico-químicas. No que respeita à generalidade dos produtos para proteção de plantas cultivadas, devem ter-se em conta as propriedades físico-químicas dos produtos e o seu uso em tratamentos químicos, a sua máxima concentração ou taxa de aplicação, o número de aplicações por estação do ano e/ou a sua persistência/permanência no solo. Para determinar se um produto químico qualquer possui propriedades fitotóxicas, pode ser apropriado testá-lo numa concentração máxima de 1 000 mg/kg de solo seco.

Ensaio de determinação da gama de concentrações

26. Quando necessário, pode ser realizado um teste de determinação da gama de concentrações para obter um intervalo de concentrações/doses a utilizar no ensaio. Neste teste, as concentrações experimentadas devem ser bastante alargadas (por exemplo, 0,1, 1,0,10, 100 e 1 000 mg/kg de solo seco). No respeitante aos produtos para proteção de plantas cultivadas, as concentrações/dose podem basear-se nas concentrações máximas ou recomendadas ou nas doses de aplicação, por exemplo, 1/100, 1/10, 1/1 da concentração máxima/recomendada ou da dose de aplicação.

Ensaio com várias concentrações/doses

27. O objetivo de um estudo com várias concentrações/doses consiste em estabelecer a relação entre a dosagem e a resposta e determinar a ECx ou a EDx, um valor para a germinação, biomassa e/ou efeitos observáveis comparados com os controlos, como requerido pelas autoridades competentes.

28. O número e o intervalo entre as concentrações ou quantidades devem ser suficientes para produzir uma resposta adequada, estabelecer uma equação de regressão e estimar a ECx e a EDx. As concentrações/doses selecionadas devem abranger os valores de ECx e EDx que se pretende determinar. Por exemplo, se se pretender determinar uma EC_{50}, o ensaio deve abranger valores que assegurem 20 a 80 % de efeitos. O número recomendado de concentrações/doses para tal é, pelo menos, 5, numa série geométrica, acrescido dos controlos, com um fator de espaçamento que não deve exceder 3. Para cada tratamento e controlo, o número de replicados deve ser,

▼M6

pelo menos, 4 e o número total de sementes, pelo menos, de 20. Para plantas com uma taxa de germinação baixa ou condições ambientais de crescimento muito variáveis, podem ser necessários mais replicados, de forma a aumentar a reprodutibilidade do tratamento estatístico. Se for necessário um grande número de concentrações/doses, o número de replicados pode ser reduzido. Se se pretender estimar a NOEC, são necessários mais replicados para fortalecer a reprodutibilidade do tratamento estatístico (23).

Observações

29. Durante o período de observação, isto é, 14 a 21 dias depois de 50 % das plantas do controlo (também do controlo/solvente, for caso disso) terem germinado, as plantas são observadas frequentemente — pelo menos, uma vez por semana e, se possível, diariamente -, para averiguar o desenvolvimento, os eventuais efeitos fitotóxicos e a mortalidade. Para o fim da experiência, devem registar-se as medidas da porção germinada e da biomassa das plantas sobreviventes, assim como os efeitos de alteração nas diferentes partes da planta. Estes efeitos incluem anomalias na morfologia das plântulas, crescimento incompleto, clorose, descoloração, mortalidade e efeitos no desenvolvimento da planta. A biomassa final pode ser medida utilizando o peso seco das plantas sobreviventes, colhendo a parte aérea das plantas e secando-a até peso constante a 60 °C. A biomassa final pode, também, ser calculada pelo peso fresco dos rebentos. O comprimento dos rebentos pode também ser utilizado, se requerido pelas autoridades competentes. Para as alterações morfológicas deve ser utilizado um sistema uniforme de critérios que permita discernir os efeitos tóxicos observados na planta. A bibliografia (23) (24) apresenta exemplos de avaliações qualitativas e quantitativas.

DADOS E RELATÓRIOS

Análise estatística

Ensaio com uma única concentração/dose

30. Os dados relativos a cada espécie devem ser analisados com um método estatístico adequado. Deve registar-se o nível do efeito para uma dada concentração/dose deve ser registado, bem como a ausência de efeitos para uma dada concentração/dose (p. ex., < x % de efeitos observados a uma concentração ou dose).

Ensaio com várias concentrações/doses

31. A relação dose/resposta é estabelecida por uma equação de regressão. Pode recorrer-se a vários modelos: por exemplo, para estimar a ECx ou a EDx (ou EC_{25}, ED_{25}, EC_{50}, ED_{50}) e os respetivos limites de confiança na germinação, podem utilizar-se, entre outros, os seguintes métodos: dados quantitativos, modelos de variável dependente binária (logit ou probit), Weibull, Spearman-Karber. Para o crescimento das plântulas (peso e comprimento), em que a ECx ou a EDx representam os estádios finais, os limites de confiança podem ser estimados por recurso a um método de regressão adequado — p. ex., análise de regressão não linear de Bruce-Versteeg (25). Sempre que possível, R^2 deve ser 0,7 — ou maior — para as espécies mais sensíveis; as concentrações selecionadas devem produzir efeitos de 20 % a 80 %. Caso se pretenda estimar a NOEC, é aconselhável a aplicação de testes estatísticos mais complexos, a selecionar com base na distribuição dos dados (26).

Relatório do ensaio

32. O relatório deve apresentar os resultados do estudo efetuado, assim como uma descrição pormenorizada das condições experimentais, uma discussão dos resultados, a análise dos dados e as conclusões retiradas da análise realizada. Devem também apresentar-se um sumário em forma tabular e um resumo dos resultados. O relatório deve incluir o seguinte:

▼**M6**

Produto químico em estudo:

— caracterização do produto químico, suas propriedades mais relevantes (por exemplo, coeficiente de partição (log P_{ow}), solubilidade em água, pressão de vapor de água e informação sobre o seu comportamento e presença no meio ambiente, se disponível);

— detalhes sobre a preparação da solução e verificação das concentrações testadas, como especificado no ponto 18.

Espécies:

— detalhes sobre o organismo selecionado: espécie/variedade, família a que pertence, nome comum e científico e história da aquisição da semente de forma tão detalhada quanto possível (isto é, nome do fornecedor, percentagem de germinação, dimensões da semente, número do lote, ano da semente ou em que altura do ano foi colhida, dados sobre a sua capacidade de germinação), viabilidade, etc.;

— número de espécies mono ou dicotiledóneas experimentadas;

— critérios de seleção das espécies;

— descrição da forma de armazenamento, tratamento e manutenção das sementes.

Condições de ensaio:

— equipamento experimental (câmaras de crescimento, fitotrões e estufas);

— descrição das condições experimentais (p. ex., dimensões e características dos vasos e quantidades de solo);

— características do solo: textura e tipo de solo: distribuição das partículas do solo, classificação física e propriedades químicas, matéria orgânica (em %), carbono orgânico (em %) e pH;

— forma de preparação do solo/substrato (solo artificial, areia e outros);

— descrição do meio de cultura utilizado;

— aplicação do produto químico: descrição do método de aplicação, descrição do equipamento, dose e volumes aplicados — incluindo a verificação do produto químico —, descrição do método de calibração e das condições ambientais durante a aplicação;

— condições de crescimento: intensidade luminosa (isto é, PAR, radiação fotossinteticamente ativa), fotoperíodo, temperaturas máxima e mínima, método e esquema de rega, fertilização;

— número de sementes por vaso, número de plantas por dose, número de replicados (vasos) por concentração experimentada;

— tipo e número de controlos (controlo negativo/positivo, controlo do solvente se utilizado);

— duração do ensaio.

Resultados:

— tabela de todos os extremos para cada replicado, concentração/dose experimentada e espécies;

— número e percentagem de plantas germinadas comparados com o controlo;

— medições de biomassa (peso seco ou fresco dos rebentos) das plantas, expressa em percentagem relativa ao controlo;

▼M6

— comprimento dos rebentos das plantas, expressa em percentagem relativa ao controlo, se aplicável;

— percentagem das alterações morfológicas observáveis e uma descrição quantitativa e qualitativa das alterações morfológicas (clorose, necrose, murchidão, deformações das folhas e dos pecíolos, assim como, a ausência de efeitos) provocadas pelo produto químico, em comparação com o controlo;

— descrição dos critérios e dos seus intervalos utilizados para qualificar os danos observados, se isso for possível;

— no caso dos ensaios com uma única concentração, deve apresentar-se a percentagem de dados observados;

— valores de EC_x ou ED_x (por exemplo, EC_{25}, ED_{25}, EC_{50}, ED_{50}) e seus limites de confiança. Quando se realiza uma análise de regressão, apresentar o erro-padrão da equação de regressão e o erro-padrão de cada parâmetro individual (por exemplo, declive, ordenada na origem);

— valores de NOEC (e LOEC), se calculados;

— descrição dos métodos estatísticos e pressupostos utilizados;

— gráficos de dados e relação dose/resposta para as espécies testadas.

Devem também referir-se quaisquer desvios aos procedimentos descritos neste protocolo e alguma ocorrência anómala durante o ensaio.

REFERÊNCIAS

(1) Schrader G., Metge K., & Bahadir M. (1998). Importance of salt ions in ecotoxicological tests with soil arthropods. Applied Soil Ecology, 7, 189--193.

(2) International Organisation of Standards. (1993). ISO 11269-1. Soil Quality - Determination of the Effects of Pollutants on Soil Flora — Part 1: Method for the Measurement of Inhibition of Root Growth.

(3) International Organisation of Standards. (1995). ISO 11269-2. Soil Quality - Determination of the Effects of Pollutants on Soil Flora — Part 2: Effects of Chemicals on the Emergence and Growth of Higher Plants.

(4) American Standard for Testing Material (ASTM). (2002). E 1963-98. Standard Guide for Conducting Terrestrial Plant Toxicity Tests.

(5) U.S. EPA. (1982). FIFRA, 40CFR, Part 158.540. Subdivision J, Parts 122-1 & 123-1.

(6) US EPA. (1996). OPPTS Harmonized Test Guidelines, Series 850. Ecological Effects Test Guidelines:

— 850,4000 Background — Non-target Plant Testing;

— 850,4025 Target Area Phytotoxicity;

— 850,4100 Terrestrial Plant Toxicity, Tier I (Seedling Emergence);

— 850,4200 Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test;

— 850,4225 Seedling Emergence, Tier II;

— 850,4230 Early Seedling Growth Toxicity Test.

(7) AFNOR, X31-201. (1982). Essai d'inhibition de la germination de semences par une substance. AFNOR X31-203/ISO 11269-1. (1993) Determination des effets des polluants sur la flore du sol: Méthode de mesurage de l'inhibition de la croissance des racines.

(8) Boutin, C., Freemark, K.E. & Keddy, C.J. (1993). Proposed guidelines for registration of chemical pesticides: Non-target plant testing and evaluation. Technical Report Series No.145. Canadian Wildlife Service (Headquarters), Environment Canada, Hull, Québec, Canada.

▼**M6**

(9) Forster, R., Heimbach, U., Kula, C., & Zwerger, P. (1997). Effects of Plant Protection Products on Non-Target Organisms — A contribution to the Discussion of Risk Assessment and Risk Mitigation for Terrestrial Non-Target Organisms (Flora and Fauna). Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd. No 48.

(10) Hale, B., Hall, J.C., Solomon, K., & Stephenson, G. (1994). A Critical Review of the Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides; Non-Target Plant Testing and Evaluation, Centre for Toxicology, University of Guelph, Ontario Canada.

(11) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sc. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).

(12) Audus, L.J. (1964). Herbicide behaviour in the soil. In: Audus, L.J. ed. *The Physiology and biochemistryof Herbicides*, London, New York, Academic Press, NY, Chapter 5, pp. 163-206.

(13) Beall, M.L., Jr. & Nash, R.G. (1969). Crop seedling uptake of DDT, dieldrin, endrin, and heptachlor from soil, J. Agro. 61:571-575.

(14) Beetsman, G.D., Kenney, D.R. & Chesters, G. (1969). Dieldrin uptake by corn as affected by soil properties, J. Agro. 61:247-250.

(15) U.S. Food and Drug Administration (FDA). (1987). Environmental Assessment Technical Handbook. Environmental Assessment Technical Assistance Document 4.07, Seedling Growth, 14 pp., FDA, Washington, DC.

(16) McKelvey, R.A., Wright, J.P., Honegger, J.L. & Warren, L.W. (2002). A Comparison of Crop and Non-crop Plants as Sensitive Indicator Species for Regulatory Testing. Pest Management Science vol. 58:1161-1174

(17) Boutin, C.; Elmegaard, N. & Kjær, C. (2004). Toxicity testing of fifteen non-crop plant species with six herbicides in a greenhouse experiment: Implications for risk assessment. Ecotoxicology vol. 13(4): 349-369.

(18) Boutin, C., & Rogers, C.A. (2000). Patterns of sensitivity of plant species to various herbicides — An analysis with two databases. Ecotoxicology vol.9(4):255-271.

(19) Boutin, C. & Harper, J.L. (1991). A comparative study of the population dynamics of five species of *Veronica* in natural habitats. J. Ecol. 9:155-271.

(20) Boutin, C., Lee, H.-B., Peart, T.E., Batchelor, S.P. & Maguire, R.J.. (2000). Effects of the sulfonylurea herbicide metsulfuron methyl on growth and reproduction of five wetland and terrestrial plant species. Envir. Toxicol. Chem. 19 (10): 2532-2541.

(21) OCDE (2006). Guidance Document, Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: *A guidance to application*. Series on Testing and Assessment No 54, Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

(22) Hatzios, K.K. & Penner, D. (1985). Interactions of herbicides with other agrochemicals in higher plants. Rev. Weed Sci. 1:1-63.

(23) Hamill, P.B., Marriage, P.B. & G. Friesen. (1977). A method for assessing herbicide performance in small plot experiments. Weed Science 25:386-389.

(24) Frans, R.E. & Talbert, R.E. (1992). Design of field experiments and the measurement and analysis of plant response. In: B. Truelove (Ed.) Research Methods in Weed Science, 2nd ed. Southern weed Science Society, Auburn, 15-23.

(25) Bruce, R.D. & Versteeg, D. J.(1992). A Statistical Procedure for Modelling Continuous Toxicity Data. Environmental Toxicology and Chemistry 11, 1485-1492.

(26) Capítulo C.33 do presente anexo (Ensaio de reprodução de minhocas *Eisenia fetida/ Eisenia andrei*).

▼M6

Apêndice 1

Definições

Ingrediente ativo (ou substância ativa): material destinado a produzir um efeito biológico específico (p. ex., combate aos insetos e às doenças das plantas, controlo das sementes na zona de tratamento); também designado por ingrediente tecnicamente ativo ou substância tecnicamente ativa.

Produto químico: uma substância ou mistura.

Produtos para proteção de plantas, ou produtos fitofarmacêuticos, ou pesticidas: produtos com uma actividade biológica específica, utilizados intencionalmente para proteger as culturas alimentares das pestes (p. ex., doenças provocadas por fungos, insectos e plantas competidoras).

EC_x (concentração com x % de efeitos) ou ER_x (dose com x % de efeitos): concentração ou dose que produz uma alteração indesejável de x % no parâmetro-alvo do ensaio, relativamente ao controlo (p. ex., uma redução de 25 % ou de 50 % na germinação, no peso dos rebentos, no número de plantas presentes no final, ou um aumento dos danos observados, constituem, respetivamente, uma EC_{25}/ER_{25} ou EC_{50}/ER_{50}).

Germinação: aparecimento dos cotilédones acima da superfície do solo.

Formulação: produto de formulação comercial que contém a substância ativa (ingrediente ativo); também designado por preparação final [1] ou produto para utilização final.

LOEC (menor concentração comnefeitos observados): concentração mais baixa do produto químico em estudo à qual se observa um efeito. No presente ensaio, a concentração correspondente à LOEC tem um efeito estatisticamente significativo ($p < 0,05$) num dado período de exposição, comparativamente com o controlo, e é mais elevada que a NOEC.

Plantas não-alvo: plantas exteriores à zona-alvo. No caso dos produtos para proteção de plantas cultivadas destinadas à alimentação, refere-se às plantas situadas fora da zona de tratamento.

NOEC (concentração sem efeitos observados): concentração mais elevada do produto químico em estudo à qual não se observam efeitos. No presente ensaio, a concentraçao correspondente à NOEC não produz efeitos estatisticamante significativos ($p < 0,05$), num dado período de exposição, comparativamente com o controlo.

Fitotoxicidade: Desvios prejudiciais (medidos e por constatação visual) à morfologia e ao crescimento normais da planta em resposta a um determinado produto químico.

Replicado: unidade experimental que representa o controlo e/ou os tratamentos. Nestes estudos, o vaso é definido como o replicado.

Avaliação visual: classificação das alterações visuais com base em observações da planta, vigor, malformações, clorose, necrose e sua aparência geral, quando comparada com o controlo.

Produto químico em estudo: Qualquer substância ou mistura testada pelo presente protocolo.

[1] Preparação final: Formulação que contém o produto químico ativo (ingrediente ativo), vendida no comércio.

▼**M6**

Apêndice 2

Lista de espécies tradicionalmente utilizadas em ensaios com plantas

Família	Espécie	Nome comum
DICOTYLEDONAE		
Apiaceae (Umbelliferae)	*Daucus carota*	Cenoura
Asteraceae (Compositae)	*Helianthus annuus*	Girassol
Asteraceae (Compositae)	*Lactuca sativa*	Alface
Brassicaceae (Cruciferae)	*Sinapis alba*	Mostarda-branca
Brassicaceae (Cruciferae)	*Brassica campestris* var. *chinensis*	Couve-da-china
Brassicaceae (Cruciferae)	*Brassica napus*	Colza
Brassicaceae (Cruciferae)	*Brassica oleracea* var. *capitata*	Couve-roxa
Brassicaceae (Cruciferae)	*Brassica rapa*	Nabo
Brassicaceae (Cruciferae)	*Lepidium sativum*	Agrião
Brassicaceae (Cruciferae)	*Raphanus sativus*	Rabanete
Chenopodiaceae	*Beta vulgaris*	Beterraba
Cucurbitaceae	*Cucumis sativus*	Pepino
Fabaceae (Leguminosae)	*Glycine max (G. soja)*	Soja
Fabaceae (Leguminosae)	*Phaseolus aureus*	Feijão preto
Fabaceae (Leguminosae)	*Phaseolus vulgaris*	Feijão-comum
Fabaceae (Leguminosae)	*Pisum sativum*	Ervilha
Fabaceae (Leguminosae)	*Trigonella foenum-graecum*	Feno-grego
Fabaceae (Leguminosae)	*Lotus corniculatus*	Cornichão
Fabaceae (Leguminosae)	*Trifolium pratense*	Trevo-vermelho
Fabaceae (Leguminosae)	*Vicia sativa*	Ervilhaca
Linaceae	*Linum usitatissimum*	Linho
Polygonaceae	*Fagopyrum esculentum*	Trigo-sarraceno
Solanaceae	*Solanum lycopersicon*	Tomate

▼**M6**

Família	Espécie	Nome comum
MONOCOTYLEDONAE		
Liliaceae (Amaryllada-ceae)	*Allium cepa*	Cebola
Poaceae (Gramineae)	*Avena sativa*	Aveia
Poaceae (Gramineae)	*Hordeum vulgare*	Cevada
Poaceae (Gramineae)	*Lolium perenne*	Azevém-perene
Poaceae (Gramineae)	*Oryza sativa*	Arroz
Poaceae (Gramineae)	*Secale cereale*	Centeio
Poaceae (Gramineae)	*Sorghum bicolor*	Sorgo-forrageiro
Poaceae (Gramineae)	*Triticum aestivum*	Trigo
Poaceae (Gramineae)	*Zea mays*	Milho

▼M6

Apêndice 3

Lista de potenciais espécies não cultivadas

OCDE Espécies vegetais que podem ser utilizadas em ensaios de toxicidade

Nota: O quadro seguinte apresenta informações sobre 52 espécies não cultivadas (as referências estão entre parêntesis para cada entrada). As taxas de germinação apresentadas provêm de artigos já publicados e só podem ser utilizadas como referência geral. As experiências podem variar em função da origem das sementes e de outros fatores.

FAMÍLIA Nome científico (nome comum, quando existente)	Longevidade [1] e Habitat	Peso das sementes (mg)	Fotoperíodo para germinação ou crescimento [2]	Profundidade de plantação (mm) [3]	Tempo de germinação (dias) [4]	Tratamentos epeciais [5]	Ensaio de toxicidade [6]	Fornecedores de sementes [7]	Outras referências [8]
APIACEAE *Torilis japonica*	A, B zonas perturbadas, sebes, pastagens (16, 19)	1.7-1.9 (14, 19)	L = D (14)	0 (1, 19)	5 (50 %) (19)	Estratificação a frio (7, 14, 18, 19); pode ser necessária maturação (19); germinação inibida pela escuridão (1, 19); sem tratamentos especiais (5)	POST (5)		
ASTERACEAE *Bellis perennis* (Margarida-vulgar)	P pradarias, terras aráveis, relvados (16, 19)	0.09-0.17 (4, 19)	L = D (14)	0 (4)	3 (50 %) (19) 11 (100 %) (18)	Germinação não afetada pela irradiância (18, 19); sem tratamentos especiais (4, 14)	POST (4)	A, D, F	7
Centaurea cyanus (Centáurea)	A campos, beiras de estradas, habitats abertos (16)	4.1-4.9 (4, 14)	L = D (14)	0-3 (2, 4, 14)	14-21 (100 %) (14)	Sem tratamentos especiais (2, 4)	POST (2,4)	A, D, E, F	7
Centaurea nigra	P campos, beiras de estradas, habitats abertos (16, 19)	2.4-2.6 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	3 (50 %) (19) 4 (97 %) (18)	Pode ser necessária maturação (18, 19); germinação inibida pela escuridão (19) sem tratamentos especiais (5, 14, 26)	POST (5, 22, 26)	A	
Inula helenium (Helénio)	P terrenos húmidos, zonas perturbadas (16)	1-1.3 (4, 14, 29)		0 (4, 29)		Sem tratamentos especiais (4)	POST (4)	A, F	

02008R0440 — PT — 16.10.2019 — 008.001 — 2040

▼M6

FAMÍLIA Nome científico (nome comum, quando existente)	Longevidade ([1]) e Habitat	Peso das sementes (mg)	Fotoperíodo para germinação ou crescimento ([2])	Profundidade de plantação (mm) ([3])	Tempo de germinação (dias) ([4])	Tratamentos epeciais ([5])	Ensaio de toxicidade ([6])	Fornecedores de sementes ([7])	Outras referências ([8])
Leontodon hispidus (Leituga-dos-montes)	P campos, beiras de estradas, zonas perturbadas (16, 19)	0.85-1.2 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	4 (50 %) (19) 7 (80 %) (18)	Germinação inibida pela escuridão (17, 18, 19); sem tratamentos especiais (5, 23)	POST (5, 22, 23)		
Rudbeckia hirta (Margarida-amarela)	B, P zonas perturbadas (16)	0.3 (4, 14)	L = D (14)	0 (4, 33)	< 10 (100 %) (33)	Sem tratamentos especiais (4, 14, 33)	POST (4, 33)	C, D, E, F	
Solidago canadensis (Tango)	P pastagens, zonas abertas (16)	0.06-0.08 (4, 14)	L = D (11)	0 (4)	14-21 (11)	Misturar em partes iguais com areia e embeber em 500 ppm GA durante 24 h (11); sem tratamentos especiais (4)	POST (4)	E, F	
Xanthium pensylvanicum	A campos, habitats abertos (16)	25-61 (14, 29)		0(1) 5(29)		Germinação pode ser inibida pela escuridão (1); embeber em água quente durante 12 h (29)	PRE & POST (31)	A	
Xanthium spinosum (Bardana-menor)	A habitats abertos (16)	200 (14)	L = D (14) L > D (6)	10 (6)		Escarificação (14); sem tratamentos especiais (6)	PRE & POST (6)	A	
Xanthium strumarium (Carrapichão)	A campos, habitats abertos (16)	67.4 (14)	L = D (14)	10-20 (6, 21)		Sem tratamentos especiais (6, 14, 21)	PRE & POST (6, 21, 28, 31)	A	
BRASSICACEAE *Cardamine pratensis* (Agrião-dos-prados)	P campos, beiras de estradas, relvados (16, 19)	0.6 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	5 (50 %) (19) 15 (98 %) (18)	Germinação inibida pela escuridão (18, 19); sem tratamentos especiais (5, 14, 22)	POST (5, 22)	F	

▼M6

FAMÍLIA Nome científico (nome comum, quando existente)	Longevidade (1) e Habitat	Peso das sementes (mg)	Fotoperíodo para germinação ou crescimento (2)	Profundidade de plantação (mm) (3)	Tempo de germinação (dias) (4)	Tratamentos epeciais (5)	Ensaio de toxicidade (6)	Fornecedores de sementes (7)	Outras referências (8)
CARYOPHYLLACEAE *Lychnis flos-cuculi*	P (16)	0.21 (14)	L = D (14)		< 14 (100 %) (14, 25)	Pode ser necessária maturação (18); sem tratamentos especiais (5, 14, 15, 22-26)	POST (5, 15, 22--26)	F	
CHENOPODIACEAE *Chenopodium album* (Ansarina-branca)	A estremas de campos, zonas perturbadas (16, 19)	0.7-1.5 (14, 19, 34)	L = D (14)	0 (1, 19)	2 (50 %) (19)	Tratamento difere consoante a cor da semente (19); dormência por armazenamento a seco (19); germinação inibida pela escuridão (1, 18, 19); estratificação a frio (18); sem tratamentos especiais (14, 34)	PRE & POST (28, 31, 34)	A	32
CLUSIACEAE *Hypericum perforatum* (Erva-de-são-joão)	P campos, terras aráveis, habitats abertos (16, 19)	0.1-0.23 (14, 19)	L= D (14)	0 (1, 19)	3 (19) 11 (90 %) (18)	Germinação inibida pela escuridão (1, 18, 19); sem tratamentos especiais (5, 14, 15, 25, 27)	POST (5, 15, 25, 27)	A, E, F	
CONVOLVULACEAE *Ipomoea hederacea* (Corda-de-viola)	A beiras de estradas, habitats abertos, milharais (16)	28,2 (14)	L > D (6, 10)	10-20 (6, 10, 21)	4 (100 %) (10)	Germinação não afetada pela irradiância (1); sem tratamentos especiais (6, 21)	PRE & POST (6, 12, 21, 28)	A	
CYPERACEAE *Cyperus rotundus* (Junça-de-conta)	P terras aráveis, pastagens, beiras de estradas (16, 30)	0,2 (14)	L= D (14)	0 (1) 10-20 (6, 10)	12 (91 %) (10)	Germinação inibida pela escuridão (1); sem tratamentos especiais (6, 10, 14)	PRE & POST (6, 28, 31)	B	7
FABACEAE *Lotus corniculatus* (Cornichão-loto)	P zonas relvadas, beiras de estradas, habitats abertos (16, 19)	1-1.67 (14, 19)	L = D (14)		1 (50 %) (19)	Escarificação (14, 19) germinação não afetada pela irradiância (18, 19); sem tratamentos especiais (23, 25)	POST (5, 23, 25)	A, D, E, F	

▼M6

FAMÍLIA Nome científico (nome comum, quando existente)	Longevidade ([1]) e Habitat	Peso das sementes (mg)	Fotoperíodo para germinação ou crescimento ([2])	Profundidade de plantação (mm) ([3])	Tempo de germinação (dias) ([4])	Tratamentos epeciais ([5])	Ensaio de toxicidade ([6])	Fornecedores de sementes ([7])	Outras referências ([8])
Senna obtusifolia (Senna-chinês)	A florestas húmidas (16)	23-28 (9)	L = D (14) L > D (9)	10-20 (6,9)		Embeber as sementes em água durante 24 horas (9); escarificação (14); a viabilidade das sementes difere consoante a sua cor (1); sem tratamentos especiais (6)	POST (6,9)	A	
Sesbania exaltata (Sesbania)	A aluviões (16)	11-13 (9, 14)	L > D (9)	10-20 (9, 21)		Embeber as sementes em água durante 24 horas (9); germinação não afetada pela irradiância (1); sem tratamentos especiais (21)	PRE & POST (9, 21, 28, 31)	A	
Trifolium pratense (Trevo-comum)	P campos, beiras de estradas, terras aráveis (16, 19)	1.4-1.7 (14, 19)	L= D (14)		1 (50 %) (19)	Escarificação (14, 18) pode ser necessária maturação (19); germinação não afetada pela irradiância (1, 19); sem tratamentos especiais (5)	POST (5)	A, E, F	
LAMIACEAE *Leonurus cardiaca* (Agripalma)	P zonas abertas (16)	0.75-1.0 (4, 14)	L= D (14)	0 (4)		Sem tratamentos especiais (4, 14)	POST (4)	F	
Mentha spicata (Hortelã-vulgar)	P zonas húmidas (16)	2,21 (4)		0 (4)		Sem tratamentos especiais (4)	POST (4)	F	
Nepeta cataria (Nêveda-dos-gatos)	P zonas perturbadas (16)	0,54 (4, 14)	L= D (14)	0 (4)		Sem tratamentos especiais (2, 4, 14)	POST (2,4)	F	

▼M6

FAMÍLIA Nome científico (nome comum, quando existente)	Longevidade ([1]) e Habitat	Peso das sementes (mg)	Fotoperíodo para germinação ou crescimento ([2])	Profundidade de plantação (mm) ([3])	Tempo de germinação (dias) ([4])	Tratamentos epeciais ([5])	Ensaio de toxicidade ([6])	Fornecedores de sementes ([7])	Outras referências ([8])
Prunella vulgaris (Prunela)	P campos aráveis, zonas relvadas, zonas perturbadas (16, 19)	0.58-1.2 (4, 14, 19)	L= D (14)	0 (4, 19)	5 (50 %) (19) 7 (91 %) (18)	Germinação inibida pela escuridão (18, 19); germinação maior com sementes maiores (1); sem tratamentos especiais (4, 14, 22)	POST (4, 22)	A, F	
Stachys officinalis (Betónica)	P pastagens, estremas de campos (19)	14-18 (14, 19)	L= D (14)		7 (50 %) (19)	Sem tratamentos especiais (5, 14, 22)	POST (5, 22)	F	
MALVACEAE *Abutilón theophrasti*	A campos, habitats abertos (16)	8,8 (14)	L= D (14)	10-20 (6, 10, 21)	4 (84 %) (10)	Escarificação (14); sem tratamentos especiais (5, 10, 21)	PRE & POST (6, 22, 28, 31)	A, F	
Sida spinosa (Guanxuma-de-espinho)	A campos, beiras de estradas (16)	3,8 (14)	L= D (14)	10-20 (6, 21)		Escarificação (14) germinação não afetada pela irradiância (1); sem tratamentos especiais (6, 21)	PRE & POST (6, 21, 28, 31)	A, F	
PAPAVERACEAE *Papaver rhoeas* (Papoila)	A campos, terras aráveis, zonas perturbadas (16, 19)	0.1-0.3 (4, 14, 19, 29)	L= D (14)	0 (4, 29)	4 (50 %) (19)	Estratificação a frio e escarificação (1, 19, 32); sem tratamentos especiais (4, 14, 29)	POST (4)	A, D, E, F, G	
POACEAE *Agrostis tenuis* (Agrostide-ténue)	relvados, pastagens (16)	0.07 (14)	L > D (IO)	20 (10)	10 (62 %) (10)	Germinação inibida pela escuridão (1, 17-19); sem tratamentos especiais (10)	POST (10)	A, E	
Alopecurus myosuroides (Rabo-de-raposa)	A campos, habitats abertos (16)	0.9-1.6 (29, 34)	L = D (14)	2 (29)	< 24 (30 %) (34)	Escarificação (14); tratamento com 101 mg/L KNO3 (14); estratificação a quente (1); germinação inibida pela escuridão (1); sem tratamentos especiais (34)	PRE & POST (28, 34)	A	32

▼M6

FAMÍLIA Nome científico (nome comum, quando existente)	Longevidade ([1]) e Habitat	Peso das sementes (mg)	Fotoperíodo para germinação ou crescimento ([2])	Profundidade de plantação (mm) ([3])	Tempo de germinação (dias) ([4])	Tratamentos epeciais ([5])	Ensaio de toxicidade ([6])	Fornecedores de sementes ([7])	Outras referências ([8])
Avena fatua (Aveia-doida)	A zonas cultivadas, habitats abertos (16)	7-37.5 (14, 30)	L = D (14) L > D (6)	10-20 (6, 10)	3 (70 %) (18)	Escarificação (7, 32); germinação inibida pela escuridão (1); estratificação a frio (1, 18); sem tratamentos especiais (6, 10, 14)	PRE & POST (6, 10, 28, 31)	A	
Bromus tectorum (Bromo)	A campos, beiras de estradas, terras aráveis (16)	0.45-2.28 (14, 29)	L = D (14)	3 (29)		Período de maturação (1, 7, 32) germinação inibida pela luz (1); sem tratamentos especiais (14)	PRE & POST (28, 31)	A	
Cynosurus cristatus (Rabo-de-cão)	P campos, beiras de estradas, habitats abertos (16, 19)	0.5-0.7 (14, 19, 29)	L = D (14)	0 (29)	3 (50 %) (19)	Germinação não afetada pela irradiância (19); sem tratamentos especiais (14, 29)	POST (5)	A	
Digitaria sanguinaiis (Milhã)	A campos, relvados, habitats abertos (16)	0.52-0.6 (14, 30)	L = D (14)	10-20 (21)	7 (75 %) 14 (94 %) (7)	Escarificação, estratificação a frio e maturação (1, 7, 14, 32) tratamento com 101 mg/l KNO3 (14); germinação inibida pela escuridão (1); sem tratamentos especiais (21)	PRE & POST (18, 25, 31)	A	
Echinochloa crusgalli (Capim-arroz)	A (16)	1.5 (14)	L = D (14) L > D (3)	10-20 (7, 21)		Escarificação (7, 32); germinação não afetada pela irradiância (1); sem tratamentos especiais (3, 14, 21)	PRE & POST (3, 21, 28, 31)	A	
Elymus canadensis	P ribeiros, zonas perturbadas (16)	4-5 (14, 30)	L = D (11)	1 (11)	14-28 (11)	Sem tratamentos especiais (2, 11)	POST (2)	C, D, E	
Festuca pratensis (Festuca-encamada)	P campos, zonas húmidas (16, 19)	1.53-2.2 (16, 19)	L = D (14) L > D (10)	20 (10)	9 (74 %) (10) 2 (50 %) (19)	Sem tratamentos especiais (10, 19)	POST (10)	A	7

▼M6

FAMÍLIA Nome científico (nome comum, quando existente)	Longevidade ([1]) e Habitat	Peso das sementes (mg)	Fotoperíodo para germinação ou crescimento ([2])	Profundidade de plantação (mm) ([3])	Tempo de germinação (dias) ([4])	Tratamentos epeciais ([5])	Ensaio de toxicidade ([6])	Fornecedores de sementes ([7])	Outras referências ([8])
Hordeum pusillum (Cevada-pequena)	A pastagens, beiras de estradas, habitats abertos (16)	3.28 (14)				Estratificação a quente (1); germinação não afetada pela irradiância (1)	PRE (31)		7
Phieum pratense	P pastagens, terras aráveis, zonas perturbadas (16, 19)	0.45 (14, 19)	L > D (10, 14)	0-10 (10, 19)	2 (74 %) (10) 8 (50 %) (19)	Germinação inibida pela escuridão (19) germinação não afetada pela irradiância (17); sem tratamentos especiais (10, 14, 17, 19)	POST (10)	A, E	
POLYGONACEAE *Polygonum convolvulus* (Erva-pessegueira)	A habitats abertos, beiras de estradas (16)	5-8 (4, 14, 29)	L = D (20)	0-2 (4, 29)		Estratificação a frio durante 4 — 8 semanas (1, 2, 4, 20, 29); germinação não afetada pela irradiância (1)	PRE & POST 1, 2, 20, 28, 31	A	32
Polygonum lapathifolium (Erva-bastarda)	A zonas húmidas (16)	1.8-2.5 (14)	L > D (6)		5 (94 %) (18)	Germinação não afetada pela irradiância (1); germinação inibida pela escuridão (18); estratificação a frio (1); sem tratamentos especiais (5)	PRE & POST (6)	A, E	
Polygonum pennsylvanicum	A campos, habitats abertos (16)	3.6-7 (14, 29)		2 (29)		Estratificação a frio durante 4 semanas a 0 — 5 °C (1, 29); germinação inibida pela escuridão (1)	PRE (31)	A, E	
Polygonum periscaria (Cristas)	A zonas perturbadas, terras aráveis (16, 19)	2.1 -2.3 (14, 19)	L > D (13)	0 (19)	< 14 (13) 2 (50 %) (19)	Escarificação, estratificação a frio, tratamento com GA (14); estratificação a frio, maturação (17-19); germinação inibida pela escuridão (19); sem tratamentos especiais (13)	POST (13)	A	32

▼M6

FAMÍLIA Nome científico (nome comum, quando existente)	Longevidade ([1]) e Habitat	Peso das sementes (mg)	Fotoperíodo para germinação ou crescimento ([2])	Profundidade de plantação (mm) ([3])	Tempo de germinação (dias) ([4])	Tratamentos epeciais ([5])	Ensaio de toxicidade ([6])	Fornecedores de sementes ([7])	Outras referências ([8])
Rumex crispus (Cata-cruz)	P terras aráveis, beiras de estradas, zonas abertas (16, 19)	1.3-1.5 (4, 14, 19)	L = D (14, 33)	0 (4, 19, 33)	3 (50 %) (19) 6 (100 %) (33)	Germinação inibida pela escuridão (18, 19); pode ser necessária maturação (18); sem tratamentos especiais (4, 14, 33)	POST (4, 33)	A, E	32
PRIMULACEAE *Anagallis arvensis* (Erva-do-garrotilho)	A terras aráveis, zonas abertas, zonas perturbadas (16, 19)	0.4-0.5 (4, 14, 19)	L = D (14)		1 (50 %) (19)	Estratificação a frio, tratamento com GA (1,14, 18, 19, 32); luz necessária para a germinação (1); sem tratamentos especiais (2, 4)	POST (2,4)	A, F	
RANUNCULACEAE *Ranunculus acris* (Ranúnculo)	P terras aráveis, beiras de estradas, zonas abertas (16, 19)	1.5-2 (14, 19, 29)	L = D (14)	1 (29)	41 -56 (19, 29)	Sem tratamentos especiais (5, 14, 22, 24 -26)	POST (5, 22, 24--26)		32
ROSACEAE *Geum urbanum* (Cariofilada)	P sebes, zonas húmidas (16, 19)	0.8-1.5 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	5 (50 %) (19) 16 (79 %) (18)	Germinação inibida pela escuridão (18, 19); estratificação a quente (1); sem tratamentos especiais (5, 14, 22, 25, 26)	POST (5, 22, 25, 26)	A	
RUBIACEAE *Galium aparine* (Amor-de-hortelão)	A terras aráveis, zonas húmidas, zonas perturbadas (16, 19)	7-9 (14, 19)	L = D (14)		5 (50 %) (19) 6 (100 %) (18)	Estratificação a frio (1, 18, 19) germinação não afetada pela irradiância (18, 19); germinação inibida pela luz (1); sem tratamentos especiais (6, 14)	PRE & POST (6, 28)	A	32

▼M6

FAMÍLIA Nome científico (nome comum, quando existente)	Longevidade ([1]) e Habitat	Peso das sementes (mg)	Fotoperíodo para germinação ou crescimento ([2])	Profundidade de plantação (mm) ([3])	Tempo de germinação (dias) ([4])	Tratamentos epeciais ([5])	Ensaio de toxicidade ([6])	Fornecedores de sementes ([7])	Outras referências ([8])
Galium mollugo (Aspérula)	P sebes, zonas abertas (8)	7 (29)	L = D (14)	2 (29)		Sem tratamentos especiais (5, 14, 22, 24, 26, 29)	POST (5, 22, 24, 26)	A	
SCROPHULARIACEAE *Digitalis purpurea* (Dedaleira)	B, P sebes, zonas abertas (16, 19)	0.1-0.6 (4, 14, 19)	L = D (14)	0 (4, 19)	6 (50 %) (19) 8 (99 %) (18)	Germinação inibida pela escuridão (1, 17-19); sem tratamentos especiais (4, 22-26)	POST (4, 22 — 26)	D, G, F	
Veronica persica (Verónica-da-pérsia)	A terras aráveis, zonas abertas, zonas perturbadas (16, 19)	0.5-0.6 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	3(19) 5 (96 %) (18)	Germinação inibida pela escuridão (18, 19) estratificação a frio (18); sem tratamentos especiais (14)	PRE & POST (28)	A	32

([1]) A = Anuais, B = Bienais, P = Perenes.
([2]) As referências 11,14 e 33 referem a relação luz (L)/escuridão (D) necessária para induzir a germinação das sementes. As referências 3, 6, 9, 10, 13, 20 dizem respeito às condições de crescimento em estufas.
([3]) 0 mm indica sementes que são semeadas à superfície do solo ou sementes que necessitam de luz para germinar.
([4]) Os números representam o número de dias necessários para uma determinada percentagem de sementes germinarem, de acordo com a referência, por exemplo, 3 dias (50 %) para germinar (referência 19).
([5]) A duração da maturação e/ou estratificação não estão sempre disponíveis. Exceto para tratamentos de frio, as condições de temperatura não estão especificadas dado que nas estufas o controlo de temperatura é limitado. A maior parte das sementes germinaram nos intervalos de temperatura existentes nas estufas.
([6]) Indica que as espécies foram utilizadas quer antes de germinarem (PRE) e/ou após a germinação (POST) em ensaios de toxicidade com herbicidas.
([7]) Apresenta exemplo(s) de fornecedores comerciais de sementes.
([8]) Apresenta as duas referências que foram consultadas.

▼**M6**

Fornecedores de sementes citados

Identificação do fornecedor	Informações gerais sobre o fornecedor
A	Herbiseed New Farm, Mire Lane, West End, Twyford RG10 0NJ ENGLAND +44 (0) 1189 349 464 www.herbiseed.com
B	Tropilab Inc. 8240 Ulmerton Road, Largo, FL 33771-3948 USA (727) 344 — 4050 www.tropilab.com
C	Pterophylla — Native Plants & Seeds #316 Regional Road 60, RR#1, Walsingham, ON N0E 1X0 CANADA (519) 586 — 3985
D	Applewood Seed Co. 5380 Vivian St., Arvada, CO 80002 USA (303) 431 — 7333 www.applewoodseed.com
E	Ernst Conservation Seeds 9006 Mercer Pike, Meadville, PA 16335 USA (800) 873 — 3321 www.ernstseed.com
F	Chiltern Seeds Bortree Stile, Ulverston, Cumbria LA12 7PB ENGLAND +44 1229 581137 www.chiltemseeds.co.uk
G	Thompson & Morgan P.O. Box 1051, Fort Erie, ON L2A 6C7 CANADA (800) 274 — 7333 www.thompson-morgan.com

REFERÊNCIAS

(1) Baskin, C.C. & Baskin, J.M. 1998. Seeds. Academic Press, Toronto

(2) Blackburn, L.G. & Boutin, C. 2003. Subtle effects of herbicide use in the context of genetically modified crops: a case study with glyphosate (Round-Up®). Ecotoxicology, 12:271-285.

(3) Boutin, C., Lee, H-B., Peart, T., Batchelor, P.S., & Maguire, R.J. 2000. Effects of the sulfonylurea herbicide metsulfuron methyl on growth and reproduction of five wetland and terrestrial plant species. Environmental Toxicology & Chemistry, 19(10):2532-2541.

(4) Boutin, C., Elmegaard, N., & Kjaer, C. 2004. Toxicity testing of fifteen non-crop plant species with six herbicides in a greenhouse experiment: implications for risk assessment. Ecotoxicology, 13:349-369.

(5) Breeze, V., Thomas, G., & Butler, R. 1992. Use of a model and toxicity data to predict the risks to some wild plant species from drift of four herbicides. Annals of Applied Biology, 121:669-677.

(6) Brown, R.A., & Farmer, D. 1991. Track-sprayer and glasshouse techniques for terrestrial plant bioassays with pesticides. In: Plants for toxicity assessment: 2nd volume. ASTM STP 1115, J.W. Gorsuch, W.R. Lower, W.Wang, & M.A. Lewis, eds. American Society for Testing & Materials, Philadelphia. pp 197 — 208.

▼**M6**

(7) Buhler, D.D. & Hoffman, M.L. 1999. Anderson's guide to practical methods of propagating weeds and other plants. Weed Science Society of America, Lawrence, K.

(8) Clapham, A.R., Tutin, T.G., & Warburg, E.F. 1981. Excursion flora of the British Isles, 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge

(9) Clay, P.A. & Griffin, J.L. 2000. Weed seed production and seedling emergence response to late-season glyphosate applications. Weed Science, 48:481-486.

(10) Cole, J.F.H. & Canning, L. 1993. Rationale for the choice of species in the regulatory testing of the effects of pesticides on terrestrial non-target plants. BCPC — Weeds. pp. 151 — 156.

(11) Fiely, M. (Ernst Conservation Seeds). 2004. Personal communication. (www.ernstseed.com)

(12) Fletcher, J.S., Johnson, F.L., & McFarlane, J.C. 1990. Influence of greenhouse versus field testing and taxonomic differences on plant sensitivity to chemical treatment. Environmental Toxicology & Chemistry, 9:769-776.

(13) Fletcher, J.S., Pfleeger, T.G., Ratsch, H.C., & Hayes, R. 1996. Potential impact of low levels of chlorsulfuron and other herbicides on growth and yield of nontarget plants. Environmental Toxicology & Chemistry, 15(7):1189-1196.

(14) Flynn, S., Turner, R.M., and Dickie, J.B. 2004. Seed Information Database (release 6.0, Oct 2004) Royal Botanic Gardens, Kew www.rbgkew.org.uk/data/sid)

(15) Franzaring, J., Kempenaar, C., & van der Eerden, L.J.M. 2001. Effects of vapours of chlorpropham and ethofumesate on wild plant species. Environmental Pollution, 114:21-28.

(16) Gleason, H.A. & Cronquist, A. 1991. Manual of vascular plants of northeastern United States and adjacent Canada, 2nd ed. New York Botanical Garden, Bronx, NY

(17) Grime, J.P. 1981. The role of seed dormancy in vegetation dynamics. Annals of Applied Biology, 98:555-558.

(18) Grime, J.P., Mason, G., Curtis, A.V., Rodman, J., Band, S.R., Mowforth, M.A.G., Neal, A.M., & Shaw, S. 1981. A comparative study of germination characteristics in a local flora. Journal of Ecology, 69:1017-1059.

(19) Grime, J.P., Hodgson, J.G., & Hunt, R. 1988. Comparative plant ecology: a functional approach to common British species. Unwin Hyman Ltd., London

(20) Kjaer, C. 1994. Sublethal effects of chlorsulfuron on black bindweed (Polygonum convolvulus L.). Weed Research, 34:453-459.

(21) Klingaman, T.E., King, C.A., & Oliver, L.R. 1992. Effect of application rate, weed species, and weed stage of growth on imazethapyr activity. Weed Science, 40:227-232.

(22) Marrs, R.H., Williams, C.T., Frost, A.J., & Plant, R.A. 1989. Assessment of the effects of herbicide spray drift on a range of plant species of conservation interest. Environmental Pollution, 59:71-86.

(23) Marrs, R.H., Frost, A.J., & Plant, R.A. 1991. Effects of herbicide spray drift on selected species of nature conservation interest: the effects of plant age and surrounding vegetation structure. Environmental Pollution, 69:223-235.

(24) Marrs, R.H., Frost, A.J., & Plant, R.A. 1991. Effects of mecoprop drift on some plant species of conservation interest when grown in standardized mixtures in microcosms. Environmental Pollution, 73:25-42.

(25) Marrs, R.H., Frost, A.J., Plant, R.A., & Lunnis, P. 1993. Determination of buffer zones to protect seedlings of non-target plants from the effects of glyphosate spray drift. Agriculture, Ecosystems, & Environment, 45:283-293.

▼**M6**

(26) Marrs, R.H. & Frost, A.J. 1997. A microcosm approach to detection of the effects of herbicide spray drift in plant communities. Journal of Environmental Management, 50:369-388.

(27) Marshall, E.J.P. & Bernie, J.E. 1985. Herbicide effects on field margin flora. BCPC — Weeds. pp. 1021-1028.

(28) McKelvey, R.A., Wright, J.P., & Honegger, J.L. 2002. A comparison of crop and non-crop plants as sensitive species for regulatory testing. Pest Management Science, 58:1161-1174.

(29) Morton, S. (Herbiseed). 2004. Personal communication. (http://www.herbiseed.com)

(30) USDA, NRCS. 2004. The Plants Database, version 3.5. (http://plants.usda.gov). National Plant Data Centre, Baton Rouge, LA 70874-4490 USA

(31) USEPA. 1999. One-Liner Database. [U.S. E.P.A./Office of Pesticide Programs/Environmental Fate and Effects Division/Environmental Epidemiology Branch].

(32) Webster, R.H. 1979. Technical Report No. 56: Growing weeds from seeds and other propagules for experimental purposes. Agricultural Research Council Weed Research Organization, Oxford.

(33) White, A. L. & Boutin, C. (National Wildlife Research Centre, Environment Canada). 2004. Personal communication.

(34) Zwerger, P. & Pestemer, W. 2000. Testing the phytotoxic effects of herbicides on higher terrestrial non-target plants using a plant life-cycle test. Z. PflKrankh. PflSchutz, Sonderh., 17:711-718.

▼**M6**

Apêndice 4

Exemplos de condições ótimas de crescimento de algumas plantas cultivadas

As condições a seguir descritas são adequadas para 10 espécies de plantas e podem ser utilizadas nos ensaios, a título de orientação, juntamente com algumas outras espécies:

Concentração de dióxido de carbono: 350 ± 50 ppm;

Humidade relativa: 70 ± 5 % durante os períodos de iluminação e 90 ± 5 % durante os períodos de obscuridade;

Temperatura: 25 ± 3 °C durante o dia, 20 ± 3 °C durante a noite;

Fotoperíodo: 16 h luz/8 h obscuridade, com um intervalo de comprimentos de onda de 400 a 700 nm;

Luz: luminosidade 350 ± 50 $\mu E/m^2/s$, medida no topo da cobertura.

As plantas cultivadas são as seguintes:

— Tomate (*Solanum lycopersicon*);

— Pepino (*Cucumis sativus*);

— Alface (*Lactuca sativa*);

— Soja (*Glycine max*);

— Couve-roxa (*Brassica oleracea* var. *capitata*);

— Cenoura (*Daucus carota*);

— Aveia (*Avena sativa*);

— Azevém-perene (*Lolium perenne*);

— Milho (*Zea mays*);

— Cebola (*Allium cepa*).

▼M6

C.32. ENSAIO DE REPRODUÇÃO COM ENQUITREÍDEOS

INTRODUÇÃO

1. Este método é equivalente ao *Test Guideline* TG 220 (2004) da OCDE. Destina-se a avaliar os efeitos de produtos químicos na reprodução de vermes da espécie *Enchytraeus albidus* Henle 1873, no solo. Baseia-se essencialmente num método desenvolvido pelo *Umweltbundesamt* da Alemanha (1), sujeito a um estudo interlaboratorial comparativo (2). Foram ponderados outros métodos para avaliar a toxicidade das substâncias químicas para os enquitreídeos e para as minhocas (3) (4) (5) (6) (7) (8).

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

2. Os anelídeos do género *Enchytraeus*, que vivem no solo, são espécies ecologicamente relevantes para ensaios ecotoxicológicos. Embora os enquitreídeos se encontrem geralmente em solos com minhocas, abundam também, com frequência, em solos isentos destas. Podem ser utilizados em ensaios laboratoriais, bem como em estudos total ou parcialmente de campo. Do ponto de vista prático, muitas espécies de enquitreídeos são de manuseamento e reprodução fáceis, sendo o seu tempo de geração significativamente inferior ao das minhocas. Assim, a duração de um ensaio de reprodução com enquitreídeos é de apenas 4 a 6 semanas, enquanto, no caso das minhocas (*Eisenia fetida*), é de 8 semanas.

3. As informações de base sobre a ecologia e a ecotoxicologia dos enquitreídeos no ambiente terrestre podem ser consultadas em (9) (10) (11) (12).

PRINCÍPIO DO ENSAIO

4. Expõem-se vermes adultos da família *Enchytraeidae* a uma gama de concentrações do produto químico em estudo misturado num solo artificial. O ensaio pode ser dividido em duas etapas: a) caso não estejam disponíveis informações suficientes, um ensaio de determinação da gama de concentrações, no qual a mortalidade, determinada após duas semanas de exposição, é o principal ponto final e b) um ensaio de reprodução definitivo no qual se avalia o número total de juvenis produzidos pelos progenitores, bem como a sobrevivência destes últimos. A duração do ensaio definitivo é de seis semanas. Após as primeiros três semanas, retiram-se os vermes adultos e registam-se as alterações morfológicas. Após um período suplementar de três semanas, contabiliza-se o número de descendentes provenientes da eclosão dos ovos postos pelos adultos. A taxa de reprodução dos animais expostos ao produto químico em estudo é comparada com a taxa de reprodução do(s) controlo(s), a fim de determinar i) a concentração sem efeitos observáveis (NOEC) e/ou ii) a EC_x (por exemplo, EC_{10}, EC_{50}), por recurso a um modelo de regressão linear de estimativa da concentração que induza um decréscimo de x % na taxa de reprodução. As concentrações de ensaio devem abranger a EC_x (por exemplo, EC_{10}, EC_{50}), para que a EC_x possa ser obtida por interpolação em vez de extrapolação.

INFORMAÇÕES SOBRE O PRODUTO QUÍMICO EM ESTUDO

5. De preferência, devem conhecer-se a solubilidade em água, o log K_{ow}, o coeficiente de partição solo-água (ver, por exemplo, os capítulos C.18 ou C.19 do presente anexo) e a pressão de vapor do produto químico em estudo. É desejável dispor de informações adicionais sobre o destino do produto químico no solo, nomeadamente as taxas de fotólise e de hidrólise.

6. O presente método de ensaio pode ser utilizado com produtos químicos solúveis ou insolúveis em água. No entanto, o modo de aplicação do produto químico em estudo varia consoante o caso. O método não é aplicável a produtos químicos voláteis, ou seja, produtos cuja constante de Henry ou cujo coeficiente de partição ar/água forem superiores a 1, nem a produtos químicos cuja pressão de vapor exceda 0,0133 Pa a 25 °C.

▼M6

VALIDADE DO ENSAIO

7. Para que um ensaio seja válido, devem ser satisfeitos os seguintes critérios relativamente aos controlos:

— a mortalidade dos animais adultos não deve exceder 20 % no final do ensaio de determinação da gama de concentrações e decorridas as primeiras três semanas do ensaio de reprodução

— pressupondo que, no ensaio, foram utilizados 10 adultos por recipiente, é de esperar que, no final, haja, em média, pelo menos, 25 juvenis

— o coeficiente de variação da média do número de juvenis não deve ser superior a 50 % no final do ensaio de reprodução.

Quando um ensaio não satisfaz os critérios de validade atrás referidos, deve ser suspenso, a não ser que exista uma justificação para o prosseguir. Essa justificação deve obrigatoriamente constar do relatório do ensaio.

PRODUTO QUÍMICO DE REFERÊNCIA

8. Deve submeter-se a ensaios regulares, ou utilizar-se em todos os ensaios, um produto químico de referência, a fim de verificar se a resposta dos organismos em estudo não varia significativamente ao longo do tempo. O carbendazime é adequado como substância química de referência, tendo sido provado que afeta a sobrevivência e a reprodução dos enquitreídeos (13) (14); podem também utilizar-se outros produtos químicos cujos dados de toxicidade sejam bem conhecidos. Num estudo interlaboratorial comparativo (2), foi utilizada uma formulação de carbendazime conhecida pela designação comercial de Derosal™, fornecida pela empresa AgrEvo (Frankfurt, Alemanha), com 360 g/l (32,18 %) de ingrediente ativo. A EC_{50} para a reprodução, determinada no estudo interlaboratorial, situava-se no intervalo 1,2 ± 0,8 mg de ingrediente ativo por quilograma de massa seca (2). Se a série de ensaios incluir um padrão tóxico positivo, utiliza-se uma concentração, devendo o número de replicados ser o mesmo que nos controlos. Para o ensaio do carbendazime em formulação líquida, recomenda-se a utilização de 1,2 mg de ingrediente ativo por kg de peso seco.

DESCRIÇÃO DO ENSAIO

Equipamento

9. Os recipientes de ensaio devem ser de vidro ou de outro material quimicamente inerte. Podem utilizar-se frascos de vidro (por exemplo, volume: 0,20-0,25 litros; diâmetro: ≈ 6 cm). Os recipientes devem ter tampas transparentes (por exemplo, de vidro ou polietileno) concebidas para reduzir a evaporação de água, mas permitindo a troca de gases entre o solo e a atmosfera. As tampas devem ser transparentes, para permitir a transmissão da luz.

10. Utiliza-se material de laboratório de uso corrente, nomeadamente o seguinte:

— estufa;

— microscópio estereoscópico;

— medidor de pH e fotómetro;

— balanças de precisão adequadas;

— equipamentos adequados para o controlo da temperatura;

— equipamentos adequados para controlo da humidade (não essencial se os recipientes de exposição tiverem tampas);

— incubadora ou pequena câmara com sistema de ar condicionado;

— pinças, ganchos ou laços;

— bacia de fotografia.

Preparação do solo artificial

11. O presente ensaio utiliza um solo artificial (5) (7) com a seguinte composição (peso seco, com secagem até à obtenção de um peso constante, a 105 °C):

▼M6

— 10 % de turfa de esfagno, seca ao ar e finamente moída (é aceitável uma granulometria de 2 ± 1 mm); recomenda-se verificar se um solo preparado com um novo lote de turfa é adequado à cultura dos vermes antes de estes serem utilizados num ensaio;

— 20 % de argila caulínica, de preferência com teor de caulinite superior a 30 %;

— aproximadamente 0,3 a 1,0 % de carbonato de cálcio ($CaCO_3$) pulverizado, de pureza analítica, de forma a obter um pH de 6,0 ± 0,5; a quantidade de carbonato de cálcio a utilizar pode depender principalmente da qualidade ou da natureza da turfa;

— Cerca de 70 % de areia de quartzo seca ao ar (em função da quantidade de $CaCO_3$ necessária), com predominância de areia fina com mais de 50 % de partículas de granulometria compreendida entre 50 e 200 μm.

Antes de utilizar um solo artificial num ensaio definitivo, é conveniente demonstrar sua adequação à cultura dos vermes e averiguar se satisfaz os critérios de validade do ensaio. Estas verificações são especialmente recomendadas para garantir que o desempenho do ensaio não é afetado se o teor de carbono orgânico do solo artificial for reduzido (por exemplo, baixando o teor de turfa para 4-5 % e aumentando concomitantemente o teor de areia). A redução do teor de carbono orgânico permite diminuir as possibilidades de adsorção do produto químico em estudo (carbono orgânico) no solo, podendo, além disso, aumentar a disponibilidade do produto para os vermes. Foi demonstrado que os espécimes de *Enchytraeus albidus* podem cumprir os critérios de validade relativos à reprodução quando sujeitos a ensaio em solos naturais com teor de carbono orgânico inferior ao referido — por exemplo, 2,7 % (15). Embora limitada, a experiência adquirida revela que o mesmo se pode também conseguir em solo artificial com 5 % de turfa.

Nota: Se o solo natural for utilizado em ensaios complementares (por exemplo, ensaios de nível superior), deve também demonstrar-se a sua adequação ao cumprimento dos critérios de validade do ensaio.

12. Misturam-se cuidadosamente (por exemplo, num misturador laboratorial de grandes dimensões) os componentes secos do solo. Esta operação deve ser executada cerca de uma semana antes do início do ensaio. O solo deve ser armazenado durante dois dias, para equilibrar ou estabilizar a acidez. Para determinar o pH, utiliza-se uma mistura de solo com uma solução de cloreto de potássio (KCl) 1 M ou de cloreto de cálcio ($CaCl_2$) 0,01 M, numa proporção de 1:5 (ver ponto 16 e apêndice 3). Se a acidez do solo exceder a gama necessária (ver ponto 11), pode ser ajustada por adição de uma quantidade adequada de $CaCO_3$. Se o solo for demasiado alcalino, o pH pode ser corrigido adicionando uma quantidade suplementar da mistura referida no ponto 11, excluindo o $CaCO_3$.

13. A capacidade máxima do solo artificial para reter água é determinada de acordo com os procedimentos descritos no apêndice 2. Um ou dois dias antes do início do ensaio, o solo artificial seco é humedecido por adição de uma quantidade de água desionizada suficiente para obter cerca de metade do teor final de água, ou seja, 40 a 60 % da capacidade máxima de retenção de água. No início do ensaio, o solo humedecido é dividido em porções

▼M6

correspondentes ao número de concentrações de ensaio (e do produto química de referência, se for caso disso) e de controlos utilizados. O teor de humidade é ajustado para 40-60 % da capacidade máxima de retenção de água com a solução do produto químico em estudo e/ou com água destilada ou desionizada (ver pontos 19 a 21). O teor de humidade é determinado no início e no final do ensaio, por secagem a peso constante, a 105 °C, devendo situar-se no intervalo de valores ideal para a sobrevivência dos vermes. Pode proceder-se a uma verificação simples do teor de humidade do solo esmagando suavemente uma amostra na mão; se o teor de humidade for correto, observam-se gotículas de água entre os dedos.

Seleção e preparação dos animais para ensaio

14. A espécie recomendada para os ensaios é a *Enchytraeus albidus* (Henle 1837), membro da família *Enchytraeidae* (ordem *Oligochaeta*, filo *Annelida*). A *E. albidus* é uma das espécies da família *Enchytraeidae* cujos indivíduos apresentam maiores dimensões, tendo sido observados alguns com 35 mm de comprimento (17) (18). A *E. albidus* está distribuída por toda a Terra, ocorrendo em habitats marinhos, de água doce e terrestres, sobretudo em matéria orgânica em decomposição (algas e produtos de compostagem) e, mais raramente, em prados (9). A sua ampla tolerância ecológica e algumas variações morfológicas indicam a possível existência de diversas subespécies.

15. A *E. albidus* encontra-se disponível no comércio, na forma de alimento para peixes. Deve verificar-se se a cultura está contaminada por outras espécies, normalmente de menores dimensões (1) (19). Se houver contaminação, lavam-se todos os vermes numa placa de Petri. Devem então selecionar-se, por meio de um microscópio estereoscópico, indivíduos adultos de *E. albidus* de grandes dimensões, com vista a iniciar uma nova cultura, rejeitando-se todos os restantes indivíduos. Os espécimes de *E. albidus* podem ser facilmente cultivados numa vasta gama de matérias orgânicas (ver apêndice 4). O ciclo de vida da *E. albidus* é curto, pois a maturidade ocorre entre os 33 dias (a 18 °C) e os 74 dias (a 12 °C). Devem utilizar-se nos ensaios apenas culturas mantidas no laboratório, sem problemas, durante, pelo menos, 5 semanas (uma geração).

16. São igualmente adequadas outras espécies do género *Enchytraeus*, como, por exemplo, *E. buchholzi* Vejdovsky 1879 ou *E. crypticus* Westheide & Graefe 1992 (ver apêndice 5). Se se utilizarem outras espécies de *Enchytraeus*, importa identificá-las claramente e justificar a seleção.

17. Os animais utilizados nos ensaios são vermes adultos. Devem conter ovos (malhas brancas) na região clitelial e as suas dimensões devem ser aproximadamente idênticas (cerca de 1 cm de comprimento). Não é necessário sincronizar a cultura de reprodução.

18. Se os espécimes não forem criados no mesmo tipo de solo e nas condições (inclusive de alimentação) utilizadas para o ensaio final, devem ser aclimatados durante, pelo menos, 24 horas, até três dias. Deve-se começar por aclimatar um número de adultos superior ao necessário para a realização do ensaio, de forma a proporcionar uma margem para a rejeição de espécimes danificados ou que, de alguma forma, se revelem inadequados. No final do período de aclimatação, apenas são selecionados para o ensaio vermes que contenham ovos e não apresentem anomalias comportamentais (como, por exemplo, tentar escapar do solo). Os vermes são removidos cuidadosamente, por recurso a pinças de joalheiro, ganchos ou laços, e colocados numa placa de Petri com uma pequena quantidade de água doce. Para este efeito, é preferível utilizar água doce reconstituída, como proposto no capítulo C.20 do presente anexo (ensaio de reprodução com *Daphnia magna*), uma vez que a água desionizada, desmineralizada ou da torneira pode ser prejudicial para os vermes. Os vermes são inspecionados com um microscópio estereoscópico, rejeitando-se os que não contenham ovos. Importa remover e eliminar quaisquer ácaros ou espécimes de *Collembola* que possam ter contaminado as culturas. Os vermes saudáveis não utilizados no ensaio são devolvidos à cultura de reserva.

▼M6

Preparação das concentrações de ensaio

Produtos químicos em estudo solúveis em água

19. Prepara-se uma solução do produto químico em estudo em água desionizada numa quantidade suficiente para todos os replicados de uma concentração de ensaio. Recomenda-se a utilização de uma quantidade de água suficiente para obter o teor de humidade necessário, isto é, 40 a 60 % da capacidade máxima de retenção de água (ver ponto 13). Cada solução do produto químico é misturada de forma homogénea num lote de solo previamente humedecido, antes da introdução deste no recipiente de ensaio.

Produtos químicos insolúveis em água

20. Os produtos químicos insolúveis em água mas solúveis em solventes orgânicos podem ser dissolvidos no volume mais baixo possível de um solvente adequado (por exemplo, acetona). Só devem utilizar-se solventes voláteis. O solvente é aspergido sobre uma pequena quantidade (por exemplo, 2,5 g) de areia de quartzo fina ou misturado com ela. É eliminado por evaporação num exaustor durante, pelo menos, uma hora. Esta mistura de areia de quartzo e produto químico é misturada com o solo previamente humedecido, procedendo-se a uma homogeneização cuidadosa após a adição de uma quantidade de água desionizada adequada para obter o teor de humidade necessário. Introduz-se a mistura final nos recipientes de ensaio.

21. No caso de produtos químicos pouco solúveis em água ou em solventes orgânicos, mistura-se o equivalente de 2,5 g de areia de quartzo finamente moída por cada recipiente de ensaio com a quantidade do produto químico em estudo, até se obter a concentração de ensaio desejada. Esta mistura de areia de quartzo e produto químico é adicionada ao solo previamente humedecido, procedendo-se a uma homogeneização cuidadosa após a adição de uma quantidade de água desionizada adequada para obter o teor de humidade necessário. Divide-se a mistura final pelos recipientes de ensaio. Repete-se o procedimento para cada concentração de ensaio, preparando-se também um controlo adequado.

22. Os produtos químicos não devem, normalmente, ser ensaiados a concentrações superiores a 1 000 mg por kg de massa seca de solo. Pode ser, contudo, necessário efetuar ensaios a concentrações mais elevadas, consoante os objetivos específicos do ensaio.

REALIZAÇÃO DO ENSAIO

Grupos de ensaio e grupos de controlo

23. Para cada uma das concentrações de ensaio, coloca-se no recipiente uma quantidade de solo de ensaio correspondente a 20 g de peso seco (ver pontos 19 a 21). Preparam-se igualmente amostras de controlo sem o produto químico em estudo. Introduzem-se alimentos em cada recipiente, de acordo com os procedimentos descritos no ponto 29. Distribuem-se aleatoriamente 10 vermes por cada recipiente de ensaio. Com o auxílio, por exemplo, de pinças de ourives, ganchos ou laços, os vermes são cuidadosamente transferidos para os recipientes de ensaio e colocados à superfície do solo. O número de replicados das concentrações de ensaio e dos controlos depende do planeamento do ensaio (ver ponto 34). Os recipientes de ensaio são posicionados na incubadora de forma aleatória, sendo as suas posições alteradas, também aleatoriamente, uma vez por semana.

24. Se se utilizar um solvente para a aplicação do produto químico em estudo, deve utilizar-se, além das séries de ensaio, uma série de controlo que contenha areia de quartzo pulverizada ou misturada com o solvente. A concentração dos solventes ou dispersantes deve ser igual à utilizada nos recipientes com o produto químico em estudo. No caso de produtos químicos que tenham de ser administrados de acordo com os procedimentos descritos no ponto 21, deve submeter-se a ensaio uma série de controlo com uma quantidade adicional de areia de quartzo (2,5 g por recipiente).

▼M6

Condições de realização do ensaio

25. A temperatura de ensaio é de 20 ± 2 °C. Para evitar a fuga de vermes do solo, o ensaio é efetuado em ciclos luz/obscuridade (de preferência, 16 horas de luz e 8 horas de obscuridade), com iluminação de 400 a 800 lux na zona dos recipientes de ensaio.

26. Para verificar a humidade do solo, os recipientes são pesados no início do ensaio e, posteriormente, uma vez por semana. A perda de peso é compensada por adição de uma quantidade adequada de água desionizada. De notar que as perdas de água podem ser reduzidas mantendo níveis elevados de humidade do ar (> 80 %) na incubadora.

27. O teor de humidade e o pH devem ser medidos no início e no final do ensaio de determinação da gama de concentrações e do ensaio definitivo. As medições devem ser feitas em amostras de solo de controlo e tratadas (com todas as concentrações), preparadas e mantidas nas mesmas condições que as culturas de ensaio, mas sem a presença de vermes. O alimento só deve ser adicionado às amostras de solo no início do ensaio, para facilitar a atividade microbiana. A quantidade de alimento deve ser a mesma que no caso das culturas de ensaio. Não é necessário colocar mais alimento nos recipientes durante o ensaio.

Alimentação

28. Pode utilizar-se qualquer alimento adequado aos enquitreídeos. Verificou-se que os flocos de aveia, de preferência tratados em autoclave antes da utilização, para evitar a contaminação microbiana (também é possível proceder a um aquecimento simples), constituem um alimento adequado.

29. O alimento é fornecido pela primeira vez dispersando 50 mg de flocos de aveia no solo de cada recipiente, antes da introdução dos vermes. Em seguida, os alimentos são fornecidos semanalmente até ao 21.º dia. Não é fornecida alimentação no 28.º dia, uma vez que, nessa fase, os adultos foram já removidos e que os juvenis têm necessidades alimentares relativamente reduzidas. A alimentação durante o ensaio é constituída por 25 mg de flocos de aveia moídos por recipiente, colocados cuidadosamente à superfície do solo, a fim de evitar ferimentos nos vermes. Para reduzir o desenvolvimento de fungos, os flocos de aveia devem ser enterrados sob pequenas quantidades de solo. Se subsistirem alimentos não consumidos, a ração deve ser reduzida.

Conceção do ensaio de determinação da gama de concentrações

30. Se necessário, efetua-se um ensaio de determinação da gama de concentrações com, por exemplo, cinco concentrações do produto químico em estudo, respetivamente 0,1, 1,0, 10, 100 e 1 000 mg/kg (peso seco de solo). Basta um replicado para cada ensaio de tratamento e de controlo.

31. O ensaio de determinação da gama de concentrações tem a duração de duas semanas. No final do ensaio, avalia-se a mortalidade dos vermes. Um verme é considerado morto se não reagir a um estímulo mecânico na extremidade anterior. Quaisquer informações adicionais sobre mortalidade podem ser úteis para estabelecer a gama de concentrações a utilizar no ensaio definitivo. As alterações de comportamento (por exemplo, incapacidade de se enterrar no solo ou imobilização junto da parede do recipiente) e de morfologia (por exemplo, presença de feridas abertas) entre os adultos devem, pois, ser registadas, juntamente com a eventual presença de juvenis. Esta última pode ser determinada utilizando o método de coloração descrito no apêndice 6.

32. A LC_{50} pode ser determinada com aproximação através do cálculo da média geométrica dos dados de mortalidade. Na fixação da gama de concentrações a utilizar no ensaio definitivo, presume-se que os efeitos na reprodução são inferiores ao valor LC_{50} num fator máximo de 10. Trata-se, contudo, de uma relação empírica, que pode divergir em certos casos específicos. Quaisquer

▼M6

outras observações registadas no ensaio de determinação da gama de concentrações, como a ocorrência de juvenis, podem contribuir para uma definição mais precisa da gama de concentrações do produto químico em estudo a utilizar para o ensaio definitivo.

33. Para uma determinação precisa do valor LC_{50}, recomenda-se que se utilizem no ensaio, pelo menos, quatro replicados de cada concentração do produto químico em estudo e um número adequado de concentrações que produzam, pelo menos, quatro respostas significativamente diferentes do ponto de vista estatístico. Deve utilizar-se um número semelhante de concentrações e de replicados nos ensaios de controlo, caso estes tenham lugar.

Conceção do ensaio de reprodução definitivo

34. Com base nas recomendações resultantes de um estudo interlaboratorial comparativo (2), propõem-se três conceções:

— Para determinar a NOEC, devem submeter-se a ensaio, pelo menos, cinco concentrações em progressão geométrica. Recomenda-se a preparação de quatro replicados de cada concentração de ensaio, além de oito controlos. As concentrações devem diferir num fator não superior a 1,8.

— Para a determinação de EC_x (por exemplo EC_{10}, EC_{50}), importa submeter a ensaio, pelo menos, cinco concentrações, que devem abranger o valor EC_x, de forma a permitir a interpolação de EC_x em vez da extrapolação. Recomenda-se que sejam utilizados, pelo menos, quatro replicados para cada concentração de ensaio e quatro replicados de controlo. O fator de espaçamento pode ser inferior ou igual a 1,8 na gama com efeitos esperados e superior a 1,8 no caso das concentrações mais e menos elevadas.

— A adoção de uma abordagem combinada permite determinar simultaneamente os parâmetros NOEC e EC_x. Para tal, utilizam-se oito concentrações de ensaio em progressão geométrica. Recomenda-se a preparação de quatro replicados de cada concentração de ensaio, além de oito controlos. As concentrações devem diferir num fator não superior a 1,8.

35. Utilizar 10 vermes adultos por recipiente de ensaio (ver ponto 23). O alimento é colocado nos recipientes no início do ensaio e, em seguida, uma vez por semana (ver ponto 29), até ao 21.º dia. No 21.º dia de ensaio, revistam-se cuidadosamente à mão as amostras de solo, observam-se e contam-se os vermes adultos vivos e registam-se as suas mudanças de comportamento (por exemplo, incapacidade de se enterrar no solo ou imobilização junto da parede do recipiente) e de morfologia (por exemplo, presença de feridas abertas). Todos os vermes adultos são então retirados dos recipientes e do solo de ensaio. Os solos de ensaio que contenham casulos são incubados durante três semanas suplementares nas mesmas condições de ensaio, com exceção da alimentação (25 mg de flocos de aveia moídos por recipiente), que só tem lugar no 35.º dia.

36. Após um prazo de seis semanas, procede-se à contagem dos vermes eclodidos. Recomenda-se o método baseado na coloração com vermelho de Bengala (ver apêndice 6), embora também se tenham revelado adequadas outras técnicas de extração e flutuação por via húmida, mas não a quente (ver apêndice 6) — (4) (10) (11) (20). A recomendação deve-se ao facto de a extração por via húmida a partir de um substrato edáfico poder ser dificultada pela turbidez decorrente de partículas de argila em suspensão.

Ensaio do limite

37. Se não forem observados efeitos com a concentração mais elevada no ensaio de determinação da gama de concentrações (1 000 mg/kg), o ensaio da reprodução pode ser executado como ensaio do limite, utilizando 1 000 mg/kg, com vista a demonstrar que a NOEC para a reprodução é superior a este valor.

▼M6

Resumo e calendário do ensaio

38. As etapas do ensaio podem ser resumidas da seguinte forma:

Momento	Ensaio de determinação da gama de concentrações	Ensaio definitivo
Dia -7 ou anterior	— Preparação do solo artificial (mistura dos componentes secos)	— Preparação do solo artificial (mistura dos componentes secos)
Dia -5	— Verificação do pH do solo artificial — Medição da capacidade máxima de retenção de água do solo	— Verificação do pH do solo artificial — Medição da capacidade máxima de retenção de água do solo
Dias -5 a -3	— Seleção dos vermes para aclimatação	— Seleção dos vermes para aclimatação
Dias -3 a 0	— Aclimatação dos vermes durante, pelo menos, 24 horas	— Aclimatação dos vermes durante, pelo menos, 24 horas
Dia -1	— Humedecimento do solo artificial e distribuição em lotes	— Humedecimento do solo artificial e distribuição em lotes
Dia 0	— Preparação das soluções de reserva — Aplicação do produto químico em estudo — Pesagem do substrato de ensaio para os recipientes de ensaio — Mistura dos alimentos — Introdução dos vermes — Medição do pH e do teor de humidade do solo	— Preparação das soluções de reserva — Aplicação do produto químico em estudo — Pesagem do substrato de ensaio para os recipientes de ensaio — Mistura dos alimentos — Introdução dos vermes — Medição do pH e do teor de humidade do solo
Dia 7	— Verificação do teor de humidade do solo	— Verificação do teor de humidade do solo — Alimentação
Dia 14	— Determinação da mortalidade dos adultos — Estimativa do número de juvenis — Medição do pH e do teor de humidade do solo	— Verificação do teor de humidade do solo — Alimentação
Dia 21		— Observação do comportamento dos adultos — Remoção dos adultos — Determinação da mortalidade dos adultos — Verificação do teor de humidade do solo — Alimentação
Dia 28		— Verificação do teor de humidade do solo — Suspensão da alimentação
Dia 35		— Verificação do teor de humidade do solo — Alimentação
Dia 42		— Contagem dos vermes juvenis — Medição do pH e do teor de humidade do solo

▼M6

DADOS E RELATÓRIOS

Tratamento dos resultados

39. Embora o apêndice 7 apresente um resumo, o presente método de ensaio não fornece orientações estatísticas definitivas para a análise dos resultados do ensaio.

40. No ensaio de determinação do intervalo de concentrações, o principal ponto final é a mortalidade. As alterações de comportamento (por exemplo, incapacidade de se enterrar no solo; imobilização junto da parede do recipiente) e de morfologia (por exemplo, presença de feridas abertas) entre os adultos devem, porém, ser também registadas, juntamente com a eventual presença de juvenis. Para determinar a LC_{50}, efetua-se em geral uma análise probit (21) ou uma regressão logística. Contudo, nos casos em que este método de análise não for adequado (por exemplo, se se tiverem utilizado menos de três concentrações parcialmente letais), podem aplicar-se métodos alternativos. De entre esses métodos, destacam-se as médias móveis (22), o método abreviado de Spearman-Karber (23) e a simples interpolação (por exemplo, média geométrica de LC_0 e LC_{100}, calculada através da raiz quadrada de LC_0 multiplicada por LC_{100}).

41. No ensaio definitivo, o ponto final é a fecundidade (ou seja, o número de juvenis produzidos). Contudo, tal como no ensaio de determinação da gama de concentrações, todos os outros sinais de nocividade devem constar do relatório final. A análise estatística exige o cálculo da média aritmética e do desvio-padrão para cada amostra de tratamento e cada amostra de controlo, no ensaio de reprodução.

42. Se tiver sido realizada uma análise de variância, o desvio-padrão, *s*, e os graus de liberdade, *df*, podem ser substituídos, respetivamente, por estimativas agregadas da variância obtidas pelo método ANOVA e pelos graus de liberdade destas, desde que a variância não dependa da concentração. Neste caso, utilizam-se as variâncias simples das amostras de controlo e de tratamento. Esses valores são geralmente calculados por recurso a um *software* estatístico comercial, utilizando os resultados por recipiente como replicados. Caso se afigure razoável proceder ao agrupamento de dados relativos aos controlos negativos e aos controlos com solvente em vez de repetir os ensaios, deve averiguar-se se apresentam diferenças significativas (para ensaios adequados, ver ponto 45 e apêndice 7).

43. A realização de uma análise estatística e de uma inferência mais aprofundadas depende da normalidade da distribuição dos valores relativos aos replicados, bem como da sua homogeneidade em termos de variância.

Estimativa da NOEC

44. Deve preferir-se o recurso a ensaios potentes. Para averiguar se os dados exibem uma distribuição aproximadamente normal, devem usar-se, por exemplo, informações provenientes da experiência anterior com estudos interlaboratoriais comparativos ou outros dados históricos. A homogeneidade da variância é mais crítica. A experiência revela que, muitas vezes, a variância aumenta com a média. Nestes casos, a transformação dos dados pode conduzir à homogeneidade da variância. No entanto, essa transformação deve basear-se na experiência adquirida com os dados históricos e não nos dados do ensaio. Com dados homogéneos, devem realizar-se testes *t* múltiplos, como o teste de Williams ($\alpha = 0{,}05$, unilateral) (24) (25) ou, em, certos casos, o teste de Dunnett (26) (27). De notar que, em caso de replicação desigual, os valores *t* do quadro devem ser corrigidos, como sugerido por Dunnett e Williams. Por vezes, devido a uma grande variação, as respostas não exibem aumento ou diminuição regulares. O teste de Dunnett é mais adequado em caso de grandes desvios relativamente à monotonicidade. Se existirem desvios à homogeneidade da variância, pode justificar-se investigar de forma mais aprofundada os possíveis efeitos nesta, de

▼M6

forma a decidir se os testes *t* podem ser executados sem perda apreciável do seu significado (28). Em alternativa, pode executar-se um teste U múltiplo, como, por exemplo, o teste de Bonferroni na versão de Holm (29), ou, se os dados apresentarem homogeneidade da variância mas forem compatíveis com uma relação dose-resposta monótona subjacente, um outro ensaio não paramétrico [por exemplo, de Jonckheere-Terpstra (30) (31) ou de Shirley (32) (33)], geralmente de preferência a testes *t* de variância desigual (ver também o esquema do apêndice 7).

45. Se for realizado um ensaio do limite e estiverem preenchidos os pré-requisitos dos procedimentos aplicáveis aos ensaios paramétricos (normalidade, homogeneidade), pode utilizar-se o teste *t* de Student par a par ou, em alternativa, o teste U de Mann-Whitney (29).

Estimativa da EC_x

46. Para o cálculo do valor EC_x, efetua-se uma análise por regressão linear e não linear da média das séries, após a obtenção de uma função adequada dose-resposta. No caso do crescimento dos vermes como resposta contínua, os valores de EC_x podem ser estimados através de uma análise de regressão adequada (35). De entre as funções de dados quantais (mortalidade/sobrevivência e número de descendentes produzidos) adequadas citam-se as funções sigmoide normal, logística e de Weibull, com dois a quatro parâmetros, alguns dos quais se adaptam também às respostas de hormese. Se uma função dose-resposta tiver sido ajustada por análise de regressão linear, deve determinar-se, com base nessa análise, um valor r^2 significativo (coeficiente de determinação) e/ou um declive, para estimar o valor de EC_x, inserindo um valor correspondente a x % da média dos controlos na equação estabelecida por análise de regressão. Os limites dos intervalos de confiança de 95 % são calculados de acordo com Fieller (citado em Finney — referência 21) ou por outros métodos modernos adequados.

47. Em alternativa, a resposta é modelizada em termos de percentagem ou proporção do parâmetro do modelo que é interpretado como a resposta média. Nestes casos, é possível ajustar facilmente aos resultados a curva sigmoide normal (curva logística ou de Weibull), por recurso ao método de regressão probit (21). Nestes casos, a função de ponderação tem de ser ajustada para ter em conta as respostas métricas — cf. Christensen (36). No entanto, se tiver ocorrido hormese, a análise probit deve ser substituída por uma função logística de quatro parâmetros ou função de Weibull, no contexto de um método de regressão não linear (36). Se não for possível adaptar os dados a uma função adequada dose-resposta, podem utilizar-se métodos alternativos para estimar o valor EC_x e os seus limites de confiança, como as médias móveis de Thompson (22) e o método abreviado de Spearman-Karber (23).

RELATÓRIO DO ENSAIO

48. O relatório do ensaio deve incluir as seguintes informações:

Produto químico em estudo:

— natureza física e, se pertinente, propriedades físico-químicas (por exemplo, solubilidade em água, pressão de vapor);

— identificação química do produto em estudo, de acordo com a nomenclatura IUPAC, número CAS, lote, fórmula estrutural e grau de pureza;

— prazo de validade da amostra.

Espécies sujeitas a ensaio:

— animais utilizados no ensaio: espécie, nome científico, origem dos organismos e condições de reprodução.

Condições de realização dos ensaios:

— ingredientes e preparação do solo artificial;

▼M6

— método de aplicação do produto químico em estudo;

— descrição das condições de ensaio, incluindo temperatura, teor de humidade, pH, etc.;

— descrição completa do planeamento experimental e dos procedimentos.

Resultados do ensaio:

— mortalidade dos vermes adultos após duas semanas e número de juvenis no final do ensaio de determinação da gama de concentrações;

— mortalidade dos vermes adultos após duas semanas e número de juvenis no final do ensaio definitivo;

— quaisquer sinais físicos ou sintomas patológicos e alterações comportamentais observadas nos organismos de ensaio;

— os valores de LC_{50}, NOEC e/ou EC_x (por exemplo, EC_{50}, EC_{10}) para a reprodução, caso alguns deles sejam aplicáveis, com intervalos de confiança, e um gráfico do modelo utilizado para o seu cálculo, bem como todas as informações e observações úteis para a interpretação dos resultados.

Desvios aos procedimentos descritos no presente método de ensaio e quaisquer ocorrências anómalas durante o mesmo.

REFERÊNCIAS

(1) Römbke, J. (1989). Entwicklung eines Reproduktionstests an Bodenorganismen — Enchytraeen. Abschlußbericht des Battelle-Instituts e.V. Frankfurt für das Umweltbundesamt (Berlin), FE-Vorhaben 106 03 051/01.

(2) Römbke, J. & Moser, T. (1999). Organisation and Performance of an International Ringtest for the Validation of the Enchytraeid Reproduction Test. UBA-Texte 4/99, 150 + 223 pp.

(3) Westheide, W. & Bethge-Beilfuss, D. (1991). The sublethal enchytraeid test system: guidelines and some results, In: Modern Ecology: Basic and Applied Aspects. Ed. by Esser, G. & Overdieck, D. pp 497-508. Elsevier, Amsterdam,

(4) Dirven-Van Breemen, E., Baerselmann, R. & Notenboom, J. (1994). Onderzoek naar de Geschiktheid van de Potwormsoorten *Enchytraeus albidus* en *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Annelida) in Bodemecotoxicologisch Onderzoek. RIVM Rapport Nr. 719102025. 46 pp.

(5) Capítulo C.8 do presente anexo (Toxicidade em relação às minhocas).

(6) ISO (International Organization for Standardization) (1993). Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). *Part 1*: Determination of acute toxicity using Artificial Soil substrate, No. 11268-1. ISO, Geneve.

(7) ISO (International Organization for Standardization) (1996). Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). *Part 2*: *Determination of effects on reproduction* (11268)]. ISO, Geneve.

(8) Rundgren, S. & A.K. Augustsson (1998). Test on the enchytraeid *Cognettia sphagnetorum* (Vejdovsky 1877). In: Løkke, H. & C.A.M. Van Gestel, Handbook of soil invertebrate toxicity tests. John Wiley & Sons, Chichester, 73-94.

(9) Kasprzak, K. (1982). Review of enchytraeid community structure and function in agricultural ecosystems. Pedobiologia 23, 217-232.

(10) Römbke, J. (1995). Enchytraeen (Oligochaeta) als Bioindikator, UWSF — Z. Umweltchem. Ökotox. 7, 246-249.

(11) Dunger, W. & Fiedler, H.J. (1997). Methoden der Bodenbiologie. G. Fischer Verlag, Stuttgart, New York.

▼M6

(12) Didden, W.A.M. (1993). Ecology of terrestrial Enchytraeidae. Pedobiologia 37, 2-29.

(13) Becker, H. (1991). Bodenorganismen — Prüfungskategorien der Forschung. UWSF — Z. Umweltchem. Ökotox. 3, 19-24.

(14) Römbke, J. & Federschmidt, A. (1995). Effects of the fungicide Carbendazim on Enchytraeidae in laboratory and field tests, Newsletter on Enchytraeidae 4, 79-96.

(15) Römbke, J., Riepert, F. & Achazi R. (2000): Enchytraeen als Testorganismen. In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.). Spektrum Verl., Heidelberg. 59-81.

(16) ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality — Determination of pH, No. 10390. ISO, Geneve.

(17) Bell, A.W. (1958). The anatomy of *Enchytraeus albidus*, with a key to the species of the genus *Enchytraeus.* Ann. Mus. Novitat. 1902, 1-13.

(18) Nielsen, C.O. & Christensen, B. (1959). The Enchytraeidae, critical revision and taxonomy of European species. Natura Jutlandica 8-9, 1-160.

(19) Bouguenec, V. & Giani, N. (1987). Deux nouvelles especes d'*Enchytraeus* (Oligochaeta, Enchytraeidae) et rediscription d'*E. bigeminus*. Remarques sur le genre *Enchytraeus*. Ann. Limnol. 23, 9-22.

(20) Korinkova, J. & Sigmund, J. (1968). The colouring of bottom-fauna samples before sorting, Vestnik Ceskoslovensko Spolecnosti Zoologicke 32, 300-305.

(21) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis (3rd ed.), pp. 19-76. Cambridge Univ. Press.

(22) Finney, D.J. (1978). Statistical Method in Biological Assay. — Charles Griffin & Company Ltd, London.

(23) Hamilton, M.A., R.C. Russo & R.V. Thurston. (1977). Trimmed Spearman-Karber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ. Sci. Technol. 11 7 16 714 -719 Correction Environ. Sci. Technol. 12(1998), 417.

(24) Williams, D.A., (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, 103-117.

(25) Williams, D.A., (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, 519-531.

(26) Dunnett, C.W., (1955). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. Amer. Statist. Ass. J. 50, 1096-1121.

(27) Dunnett, C.W., (1964) New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20, 482-491.

(28) Hoeven, N. van der, (1998). Power analysis for the NOEC: What is the probability of detecting small toxic effects on three different species using the appropriate standardized test protocols? Ecotoxicology 7: 355-361

(29) Holm, S., (1979): A simple sequentially rejective multiple test procedure. Scand. J. Statist. 665-70

(30) Jonckheere, A. R. (1954); A Distribution-free k-Sample Test Against Ordered Alternatives, Biometrika 41, 133-145.

(31) Terpstra, T. J. (1952); The Asymptotic Normality and Consistency of Kendall's Test Against Trend, When Ties are Present in One Ranking, Indagationes Math. 14, 327-333.

(32) Shirley, E. A. (1979); The comparison of treatment to control group means in toxicology studies, Applied Statistics 28, 144-151.

▼**M6**

(33) Williams, D.A. (1986); A Note on Shirley's Nonparametric Test for Comparing Several Dose Levels with a Zero-Dose Control, Biometrics 42, 183--186.

(34) Sokal, R.R. & F.J. Rohlf. (1981). Biometry. The Principle and practice of statistics in biological research. 2nd edition. W.H. Freeman & Company. New York.

(35) Christensen, E.R., (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18, 213-221.

(36) Van Ewijk, P.H. & J.A. Hoekstra. (1993). Calculation of the EC50 and its confidence interval when sub-toxic stimulus is present. Ecotox, Environ. Safety. 25, 25-32.

▼M6

Apêndice 1

Definições

No âmbito do presente método de ensaio, aplicam-se as seguintes definições:

Produto químico: substância ou mistura.

EC_x (concentração com x % de efeitos): concentração que causa efeitos em x % dos organismos ensaiados durante um determinado período de exposição, comparativamente ao grupo de controlo. No presente ensaio, as concentrações são expressas em massa do produto químico em estudo por massa seca de solo utilizado.

LC_0 (concentração não letal): concentração de um produto químico em estudo que não mata nenhum dos organismos de ensaio expostos durante um determinado período. No presente ensaio, os valores de LC_0 são expressos em massa do produto químico em estudo por massa seca de solo utilizado.

LC_{50} (concentração letal mediana): concentração de um produto químico em estudo que mata 50 % dos organismos de ensaio expostos num determinado período. No presente ensaio, os valores de LC_{50} são expressos em massa do produto químico em estudo por massa seca de solo utilizado.

LC_{100} (concentração letal total): concentração de um produto químico em estudo que mata 100 % dos organismos de ensaio expostos num determinado período. No presente ensaio, os valores de LC_{100} são expressos em massa do produto químico em estudo por massa seca de solo utilizado.

LOEC (menor concentração com efeitos observáveis): a menor concentração da substância química em estudo que tem um efeito estatisticamente significativo ($p < 0,05$). No presente ensaio, os valores de LOEC são expressos em massa do produto químico em estudo por massa seca de solo utilizado. Em geral, todas as concentrações de ensaio superiores à LOEC devem apresentar um efeito estatisticamente diferente das amostras de controlo. Quaisquer desvios em relação às condições referidas para a identificação da LOEC devem ser justificados no relatório de ensaio.

NOEC (concentração sem efeitos observáveis): a concentração mais elevada do produto químico em estudo imediatamente abaixo da LOEC à qual não se observa nenhum efeito. Neste ensaio, a concentração NOEC não tem nenhum efeito com significância estatística ($p < 0,05$) num determinado período de exposição, comparativamente ao grupo de controlo.

Taxa de reprodução: média do número de juvenis produzidos por um dado número de vermes adultos, no período de ensaio.

Produto químico em estudo: qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado o presente método de ensaio.

▼M6

Apêndice 2

Determinação da capacidade máxima de retenção de água

Determinação da capacidade de retenção de água do solo artificial

O método que se segue foi considerado adequado. É descrito no anexo C da norma ISO DIS 11268-2.

Recolher uma determinada quantidade (por exemplo, 5 g) de substrato de solo de ensaio com o auxílio de um instrumento adequado (tubo Auger, etc.). Cobrir o fundo do tubo com um pedaço de papel de filtro e, após o enchimento com água, introduzi-lo num suporte de banho-maria. O tubo deve ser submergido gradualmente, até que o nível de água se situe acima do topo da camada de solo. Deixar o tubo no banho-maria durante cerca de três horas. Dado não ser possível reter toda a água absorvida por capilaridade, deve deixar-se a amostra de solo escorrer durante duas horas, colocando o tubo num leito de areia de quartzo finamente moída e muito húmida, contido num recipiente fechado (para evitar a secagem). A amostra deve, em seguida, ser pesada e seca até massa constante à temperatura de 105 °C. A capacidade de retenção de água (WHC) pode ser calculada do seguinte modo:

$$\text{WHC (em \% da massa seca)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

em que:

S = substrato saturado de água + massa do tubo + massa do papel de filtro

T = tara (massa do tubo + massa do papel de filtro)

D = massa seca de substrato

REFERÊNCIAS:

ISO (Organização Internacional de Normalização) (1996). Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, No.11268-2. ISO, Geneve.

▼**M6**

Apêndice 3

Determinação do pH do solo

O seguinte método de determinação do pH de uma amostra de solo baseia-se na descrição constante da norma ISO 10390 (Qualidade do solo — Determinação de pH).

Uma determinada quantidade de solo é seca à temperatura ambiente durante, pelo menos, 12 horas. A uma suspensão de solo que contenha, pelo menos, 5 g de solo adiciona-se cinco vezes o seu volume de uma solução 1 M de cloreto de potássio (KCl) de qualidade analítica ou de uma solução 0,01 M de cloreto de cálcio ($CaCl_2$) também de qualidade analítica. A suspensão é agitada vigorosamente durante cinco minutos. Após a agitação, deixa-se a suspensão em repouso durante, pelo menos, 2 horas, mas não mais de 24 horas. O pH da fase líquida é então medido por recurso a um medidor de pH, calibrado, antes de cada medição, com uma série adequada de soluções-tampão (por exemplo, pH 4,0 e 7,0).

REFERÊNCIAS:

ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality — Determination of pH, No. 10390. ISO, Geneve.

▼M6

Apêndice 4

Condições de cultura de *Enchytraeus sp.*

Os enquitreídeos da espécie *Enchytraeus albidus* (bem como de outras espécies de *Enchytraeus*) podem ser cultivados em grandes caixas de plástico (por exemplo, 30 × 60 × 10 cm) cheias com uma mistura na proporção 1:1 de solo artificial e solo natural para jardinagem, não contaminado. Devem evitar-se materiais de compostagem, pois podem conter produtos químicos tóxicos, como metais pesados. Antes da utilização, deve remover-se qualquer fauna do solo (por exemplo, por ultracongelamento). É também possível utilizar um substrato que contenha apenas solo artificial, caso em que a taxa de reprodução pode ser mais baixa do que a obtida com um substrato de solo misto. O substrato para cultura deve ter um pH de 6,0 ± 0,5.

A cultura é mantida na obscuridade, a uma temperatura de 15 a 20 °C ± 2 °C. Devem evitar-se temperaturas superiores a 23 °C O solo deve estar apenas ligeiramente húmido. O teor correto de humidade do solo é indicado pelo surgimento de gotículas de água entre os dedos ao espremer ligeiramente o solo. Deve evitar-se o surgimento de condições anóxicas, garantindo que as coberturas dos recipientes de cultura permitem uma permuta adequada de gases com o ar ambiente. O solo deve ser cuidadosamente remexido todas as semanas, para facilitar o arejamento.

Os vermes podem ser alimentados com flocos de aveia. Os flocos de aveia devem ser guardados em recipientes herméticos e tratados em autoclave ou aquecidos antes da sua ministração, para evitar a infestação com ácaros (– por exemplo, *Glyzyphagus sp.*, *Astigmata*, *Acarina*) ou *Hypoaspis* (*Cosmolaelaps) miles*, *Gamasida*, *Acarina*]. Após o tratamento a quente, os flocos devem ser moídos, para poderem ser facilmente espalhados na superfície do solo. Periodicamente, os flocos de aveia podem ser complementados pela adição de vitaminas, leite e óleo de fígado de bacalhau. O fermento de padaria e a comida para peixes TetraMin constituem outras fontes adequadas de alimento.

A alimentação tem lugar, aproximadamente, duas vezes por semana. Espalha-se uma quantidade adequada de flocos de aveia na superfície do solo e mistura-se cuidadosamente com o substrato ao remexer o solo para facilitar o arejamento. A quantidade de alimento fornecida, em termos absolutos, depende do número de vermes presentes no substrato. A título indicativo, deve aumentar-se a quantidade de alimentos se os mesmos tiverem sido totalmente consumidos um dia após o seu fornecimento. Reciprocamente, se subsistirem alimentos à superfície no momento da segunda alimentação (uma semana mais tarde), esta deve ser reduzida. Os alimentos contaminados com fungos devem ser removidos e substituídos. Decorridos três meses, transferem-se os vermes para um substrato recém-preparado.

As condições de cultura são consideradas satisfatórias se os vermes: a) não tentarem escapar do substrato de solo, b) se movimentarem com rapidez no solo, c) exibirem uma superfície exterior luzidia, sem aderirem às partículas do solo, d) apresentarem cor esbranquiçada, e) exibirem uma diversidade de gamas etárias nas culturas e f) se reproduzirem em permanência.

▼M6

Apêndice 5

Desempenho do ensaio com outras espécies *Enchytraeus*

Seleção das espécies

Podem ser utilizadas outras espécies além da *E. albidus*, mas o procedimento de ensaio e os critérios de validade têm de ser adaptados em conformidade. Dado que muitas espécies *Enchytraeus* são facilmente acessíveis e podem ser conservadas de forma satisfatória nos laboratórios, o critério mais importante na seleção de espécies diferentes da *E. albidus* reside na importância ecológica e ainda na sensibilidade comparável. Pode também haver motivos de ordem formal para utilizar outra espécie. Por exemplo, nos países em que a *E. albidus* não ocorra e não possa ser importada — devido, por exemplo, a restrições de quarentena –, será necessário recorrer a outra espécie *Enchytraeus*.

Exemplos de espécies alternativas adequadas

— *Enchytraeus crypticus* (Westheide & Graefe 1992): nos últimos anos, esta espécie foi frequentemente utilizada em estudos ecotoxicológicos, dada a simplicidade da sua criação e da sua sujeição a ensaio. Contudo, as suas pequenas dimensões relativamente à *E. albidus* dificultam a manipulação, em especial nas etapas que precedem o método de coloração. Não está provado que a *E. crypticus* ocorra no campo, uma vez que tem sido descrita apenas em culturas de minhocas. Por conseguinte, desconhecem-se as suas exigências ecológicas.

— *Enchytraeus buchholzi* (Vejdovsky 1879): esta designação abrange provavelmente um grupo de espécies muito próximas que são morfologicamente difíceis de distinguir. Não se recomenda a sua utilização nos ensaios até que a espécie a que pertencem os indivíduos seja identificada. A *E. buchholzi* encontra-se geralmente em prados e locais movimentados, como a proximidade de estradas.

— *Enchytraeus luxuriosus*: Esta espécie, recentemente descrita (1), foi inicialmente designada por *E. «minutus»*. Foi descoberta por U. Graefe, de Hamburgo, em pastagens na zona de St. Peter-Ording (Schleswig-Holstein, Alemanha). A *E. luxuriosus* tem aproximadamente metade do comprimento da *E. albidus*, mas é maior do que as outras espécies mencionadas neste contexto; pode constituir uma boa alternativa à *E. albidus*.

— *Enchytraeus bulbosus* (Nielsen & Christensen 1963): tem sido referida a ocorrência desta espécie em solos minerais na Alemanha e em Espanha, onde é comum mas, geralmente, não muito abundante. Em comparação com outras espécies pequenas do seu género, é relativamente fácil de identificar. Não são conhecidos o seu comportamento em testes laboratoriais nem a sua sensibilidade a produtos químicos. Verificou-se, contudo, que a sua cultura é fácil (E. Belotti, comunicação pessoal).

Condições de reprodução

Todas as espécies *Enchytraeus* atrás referidas podem ser cultivadas nos substratos utilizados para a *E. albidus*. Devido às suas dimensões mais reduzidas, os recipientes de cultura podem ser menores. Embora se possam utilizar os mesmos alimentos, as rações têm de ser ajustadas. Estas espécies têm um ciclo de vida mais curto do que o da *E. albidus* e precisam de ser alimentadas com maior frequência.

Condições de realização do ensaio

As condições de ensaio são, em geral, as mesmas que no caso da *E. albidus,*, exceto que:

— o recipiente de ensaio pode ser menor;

— a duração do ensaio de reprodução pode ser mais curta (por exemplo, quatro semanas em vez de seis); contudo, a duração do ensaio de determinação da gama de concentrações deve permanecer inalterada;

— atendendo às pequenas dimensões dos vermes juvenis, recomenda-se vivamente o recurso ao método de coloração para a sua contagem;

— o critério de validade relativo ao «número de juvenis em cada recipiente de ensaio nos controlos» deve ser alterado para «50».

▼**M6**

REFERÊNCIAS

(1) Schmelz, R.M. & Collado, R. (1999). Enchytraeus luxuriosus sp.nov., a new terrestrial oligochaete species (Enchytraeidae, Clitellata, Annelida). Carolinea 57, 93-100.

▼M6

Apêndice 6

Descrição pormenorizada das técnicas de extração

Coloração com vermelho de Bengala

Este método, desenvolvido originalmente no contexto da ecologia de sistemas limosos (1), foi proposto por W. de Coen (Universidade de Gante, Bélgica) para a contagem de enquitreídeos juvenis no ensaio de reprodução. Independentemente, foi elaborada por RIVM Bilthoven (2) (3) uma versão modificada, que utiliza vermelho de Bengala misturado com formaldeído em vez de etanol.

No final do ensaio definitivo (ou seja, decorridas seis semanas), os solos dos recipientes de ensaio são transferidos para um recipiente pouco profundo. Para o efeito, é adequado um recipiente Bellaplast ou uma bacia de fotografia de fundo rugoso, dado que as nervuras restringem a circulação dos vermes no campo de observação. Os juvenis são fixados com etanol (cerca de 5 ml por replicado). Os recipientes são enchidos com água até uma altura de 1 a 2 cm. Adicionam-se algumas gotas (200 to 300 µl) de vermelho de Bengala (solução a 1 % em etanol), ou, em alternativa, de eosina a 0,5 %, e misturam-se cuidadosamente os dois componentes. Após 12 horas, os vermes devem apresentar-se avermelhados, sendo fáceis de contar, pois estarão sobre a superfície do substrato. Em alternativa, a mistura substrato/álcool pode ser lavada através de uma peneira (dimensão da malha: 0,250 mm) antes da contagem dos vermes. Em consequência deste processo, a caulinite, a turfa e uma parte da areia são eliminadas, o que faz com que os vermes, de coloração avermelhada, se tornem mais visíveis e fáceis de contar. O recurso a lentes iluminadas (de dimensões mínimas 100 × 75 mm, com uma ampliação de 2 a 3 vezes) também facilita a contagem.

A técnica de coloração reduz o tempo de contagem a alguns minutos por recipiente; a título de orientação, deve ser possível a uma única pessoa proceder à avaliação de todos os recipientes de um ensaio num prazo máximo de dois dias.

Extração por via húmida

A extração por via húmida deve ter início imediatamente após o termo do ensaio. O solo de cada recipiente de ensaio é colocado em crivos de plástico com malha de cerca de 1 mm. Os crivos são seguidamente suspensos em recipientes de plástico, sem contacto com o fundo. Os recipientes são cuidadosamente enchidos com água até que as amostras nos crivos estejam totalmente imersas. Para garantir uma taxa de recuperação superior a 90 % do número total de vermes presentes, é conveniente utilizar um período de extração de 3 dias, a 20 °C ± 2 °C. No final do período de extração, retiram-se os crivos e decanta-se lentamente a água (com exceção de uma pequena quantidade), devendo ter-se o cuidado de não perturbar os sedimentos na parte inferior dos recipientes. Agitam-se em seguida ligeiramente os recipientes de plástico, com o objetivo de suspender os sedimentos na água sobrenadante. Transfere-se a água para uma placa de Petri. Quando as partículas de solo tiverem assentado, os enquitreídeos podem ser identificados, retirados e contabilizados, com o auxílio de um microscópio estereoscópico e de uma pequena pinça de aço.

Flutuação

Existe um método baseado na flutuação, descrito numa nota de R. Kuperman (4). Após a fixação com etanol do conteúdo de um recipiente de ensaio, o solo é embebido em Ludox (suspensão aquosa de sílica coloidal AM-30 a 30 % em massa) até 10 a 15 mm acima da superfície. Após homogeneização do solo com o agente de flutuação durante 2 a 3 minutos, podem contar-se facilmente os vermes juvenis que flutuam à superfície.

REFERÊNCIAS

(1) Korinkova, J. & Sigmund, J. (1968). The colouring of bottom-fauna samples before sorting, Vestnik Ceskoslovensko Spolecnosti Zoologicke 32, 300-305.

▼**M6**

(2) Dirven-Van Breemen, E., Baerselmann, R. & Notenboom, J. (1994). Onderzoek naar de Geschiktheid van de Potwormsoorten *Enchytraeus albidus* en *Enchytraeus crypticus* (*Oligochaeta*, *Annelida*) in Bodemecotoxicologisch Onderzoek. RIVM Rapport Nr. 719102025. 46 pp.

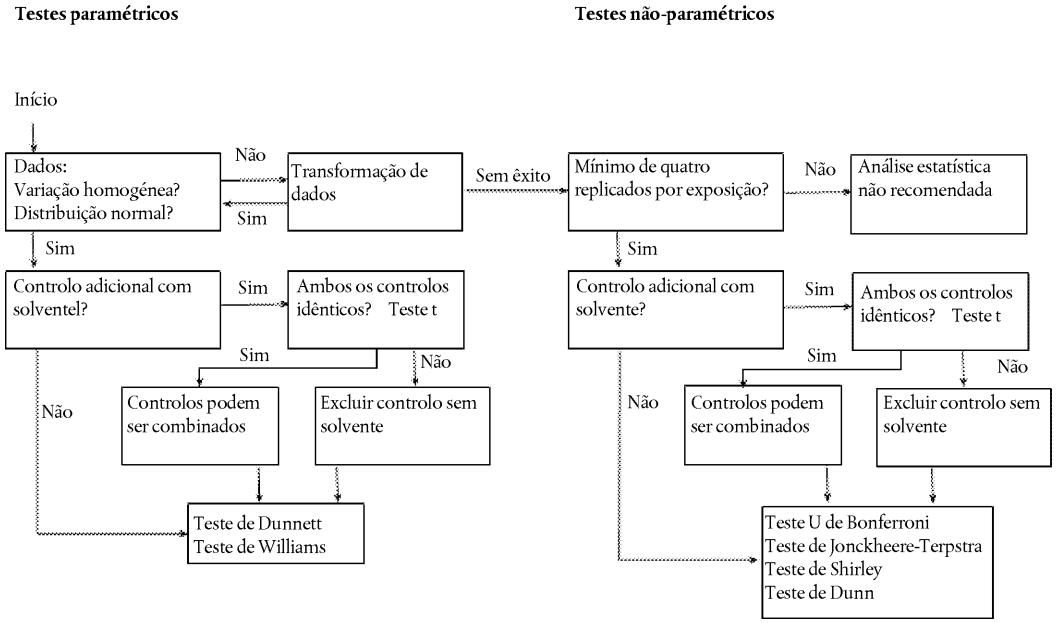
(3) Posthuma, L., Baerselmann, R., Van Veen, R.P.M. & Dirven-Van Breemen, E.M. (1997). Single and joint toxic effects of copper and zinc on reproduction of *Enchytraeus crypticus* in relation to sorption of metals in soils. Ecotox. Envir. Safety 38, 108-121.

(4) Phillips, C.T., Checkai, R.T. & Kuperman, R.G. (1998). An alternative to the O'Connor Method for Extracting Enchytraeids from Soil. SETAC 19th Annual Meeting, Charlotte, USA. Abstract Book No. PMP069, p. 157.

▼**M6**

Apêndice 7

Resumo da avaliação estatística dos dados (determinação da NOEC)



▼M6

C.33. ENSAIO DE REPRODUÇÃO DE MINHOCAS (*EISENIA FETIDA/ EISENIA ANDREI*)

INTRODUÇÃO

1. Este método é equivalente ao *Test Guideline* TG 222 (2004) da OCDE. Destina-se a avaliar os efeitos que produtos químicos presentes no solo têm na reprodução (e em outros parâmetros subletais) de minhocas das espécies *Eisenia fetida* (Savigny 1826) e *Eisenia andrei* (Andre 1963) (1) (2). Foi submetido a um estudo interlaboratorial comparativo (3). Existe já um método de ensaio para a toxicidade aguda em minhocas (4). Foram publicadas diversas diretrizes internacionais e nacionais para a realização de ensaios de toxicidade aguda e crónica em minhocas (5) (6) (7) (8).

2. A *Eisenia fetida/ Eisenia andrei* é considerada representativa da fauna do solo e, em particular, das minhocas. Estão disponíveis informações de base sobre a ecologia das minhocas e a sua utilização em ensaios ecotoxicológicos (7) (9) (10) (11) (12).

PRINCÍPIO DO ENSAIO

3. Os vermes adultos são expostos a uma gama de concentrações do produto químico, quer em mistura com o solo quer, no caso dos pesticidas, em aplicação no interior ou à superfície do solo, através de procedimentos compatíveis com o padrão de utilização do produto químico. O método de aplicação é específico da finalidade do ensaio. A gama de concentrações de ensaio é selecionada de forma a englobar as concentrações suscetíveis de causarem efeitos subletais e letais num período de oito semanas. A mortalidade e os efeitos no crescimento das minhocas adultas são determinados após 4 semanas de exposição. Decorrido um novo período de 4 semanas, os adultos são retirados do solo, avaliando-se os efeitos na reprodução por contagem do número de descendentes presentes no solo. A taxa de reprodução dos vermes expostos ao produto químico em estudo é comparada com a taxa de reprodução do(s) controlo(s), a fim de determinar i) a concentração sem efeitos observáveis (NOEC) e/ou ii) a EC_x (por exemplo, EC_{10}, EC_{50}), por recurso a um modelo de regressão linear para estimar a concentração que induz um decréscimo de x % na taxa de reprodução. As concentrações de ensaio devem abranger a EC_x (por exemplo, EC_{10}, EC_{50}), para que a EC_x possa ser obtida por interpolação em vez de extrapolação (ver definições no apêndice 1).

INFORMAÇÕES SOBRE O PRODUTO QUÍMICO EM ESTUDO

4. Tendo em vista a elaboração de procedimentos de ensaio adequados, deve dispor-se das seguintes informações relativas ao produto químico em estudo:

   — solubilidade em água;

   — log K_{ow};

   — pressão de vapor;

   — informações sobre o destino e o comportamento no ambiente, sempre que possível (por exemplo, taxa de fotólise e taxa de hidrólise, quando pertinente para os padrões de aplicação).

5. O presente método de ensaio é aplicável a todos os produtos químicos, independentemente da sua solubilidade em água. O método não é aplicável a produtos químicos voláteis, definidos como produtos químicos cuja constante de Henry ou cujo coeficiente de partição ar/água são superiores a 1, nem a produtos químicos cuja pressão de vapor excede 0,0133 Pa a 25 °C.

6. Não é tida em conta uma eventual degradação do produto químico em estudo durante o período de ensaio. Por conseguinte, não se pode presumir que as concentrações de exposição se manterão ao longo de todo o ensaio. Em tais casos, recomenda-se uma análise química do produto químico, no início e no final do ensaio.

▼M6

PRODUTO QUÍMICO DE REFERÊNCIA

7. É necessário determinar a NOEC e/ou a EC_x de um produto químico de referência, de forma a garantir que as condições de ensaio laboratoriais são adequadas e a averiguar se, do ponto de vista estatístico, a resposta dos organismos de ensaio não sofre alterações ao longo do tempo. É aconselhável proceder ao ensaio de um produto químico de referência pelo menos uma vez por ano ou, se os ensaios forem realizados com menor frequência, em paralelo com a determinação da toxicidade do produto químico em estudo. O carbendazime e o benomil são produtos de referência adequados, tendo-se demonstrado que afetam a reprodução (3). Devem observar-se efeitos significativos com concentrações a) entre 1 e 5 mg de ingrediente ativo por quilograma de massa seca ou b) entre 250 e 500 g/ha ou 25 e 50 mg/m^2. Se a série de ensaios incluir um padrão tóxico positivo, utiliza-se uma concentração, devendo o número de replicados ser o mesmo que nos controlos.

VALIDADE DO ENSAIO

8. Para que os resultados de um ensaio sejam considerados válidos, os controlos devem satisfazer os seguintes critérios:

— cada replicado (com 10 animais adultos) deve produzir um número de juvenis ≥ 30 no final do ensaio;

— o coeficiente de variação da taxa de reprodução deve ser ≤30 %;

— a mortalidade dos adultos nas quatro primeiras semanas do teste deve ser ≤10 %.

Quando um ensaio não satisfaz os critérios de validade atrás referidos, deve ser suspenso, a não ser que exista uma justificação para o prosseguir. Essa justificação deve obrigatoriamente constar do relatório do ensaio.

DESCRIÇÃO DO ENSAIO

Equipamento

9. Devem utilizar-se recipientes de vidro ou de outro material quimicamente inerte, com capacidade aproximada de 1 a 2 litros. Os recipientes devem ter uma secção transversal de cerca de 200 cm^2, para que a adição de 500 a 600 g de massa seca de substrato produza um substrato húmido com cerca de 5 a 6 cm de profundidade. A conceção da tampa do recipiente deve permitir trocas gasosas entre o substrato e a atmosfera, bem como a entrada de luz (por exemplo, através de uma cobertura transparente perfurada), evitando, simultaneamente, a fuga dos vermes. Se a quantidade de substrato utilizada no ensaio for bastante superior a 500-600 g por recipiente, o número de vermes deve ser aumentado proporcionalmente.

10. Utiliza-se material de laboratório de uso corrente, nomeadamente o seguinte:

— estufa;

— microscópio estereoscópico;

— medidor de pH e fotómetro;

— balanças de precisão adequadas;

— equipamentos adequados para o controlo da temperatura;

— equipamentos adequados para controlo da humidade (não essencial se os recipientes de exposição tiverem tampas);

— incubadora ou pequena câmara com sistema de ar condicionado;

— pinças, ganchos ou laços;

— banho-maria.

▼M6

Preparação do solo artificial

11. O presente ensaio utiliza um solo artificial (5) (7) com a seguinte composição (peso seco, com secagem até à obtenção de um peso constante, a 105 °C):

— 10 % de turfa de esfagno, com um pH tão próximo quanto possível de 5,5-6,0, sem resíduos vegetais visíveis, finamente moída, seca até um determinado teor de humidade);

— 20 % de argila caulínica, de preferência com teor de caulinite superior a 30 %;

— 0,3 a 1,0 % de carbonato de cálcio ($CaCO_3$) pulverizado, de pureza analítica, de forma a que o pH inicial seja de 6,0 ± 0,5;

— 70 % de areia de quartzo seca ao ar (em função da quantidade de $CaCO_3$ necessária), com predominância de areia fina com mais de 50 % de partículas de granulometria compreendida entre 50 e 200 μm.

Nota 1: A quantidade necessária de $CaCO_3$ depende dos componentes do substrato edáfico, incluindo os alimentos, e deve ser determinada através de medições em pequenas amostras de solo imediatamente antes do ensaio. O pH é medido com uma amostra mista, numa solução 1 M de cloreto de potássio (KCl) ou numa solução 0,01 M de cloreto de cálcio ($CaCl_2$) (13).

Nota 2: Pode reduzir-se o teor de carbono orgânico do solo artificial — por exemplo, baixando o teor de turfa para 4-5 % e aumentando correspondentemente o teor de areia. A redução do teor de carbono orgânico permite diminuir as possibilidades de adsorção do produto químico em estudo (carbono orgânico) no solo, podendo, além disso, aumentar a disponibilidade do produto para os vermes. Foi demonstrado que a espécie *Eisenia fetida* pode cumprir os critérios de validade relativos à reprodução quando sujeita a ensaio em solos naturais com teor de carbono orgânico inferior — por exemplo, 2,7 % (14). A experiência adquirida revela que o mesmo se pode também conseguir num solo artificial com 5 % de turfa. Por conseguinte, antes da utilização de um solo artificial num ensaio definitivo, não é necessário demonstrar a sua adequação aos critérios de validade do ensaio, exceto se o teor de turfa for inferior ao atrás referido.

Nota 3: Se se utilizar solo natural em ensaios complementares (por exemplo, ensaios de nível superior), deve também demonstrar-se a sua adequação ao cumprimento dos critérios de validade do ensaio.

12. Misturam-se cuidadosamente os componentes secos do solo (por exemplo, com auxílio de um misturador laboratorial de grandes dimensões), numa zona bem arejada. Antes do início do ensaio, o solo artificial seco é humedecido por adição de uma quantidade de água desionizada suficiente para a obtenção de cerca de metade do teor final de água, ou seja, 40 a 60 % da capacidade máxima de retenção de água (correspondente a massa seca humedecida a 50 ± 10 %). Produz-se assim um substrato isento de água fixa ou livre, quando comprimido na mão. A capacidade máxima do solo artificial para reter água é determinada de acordo com os procedimentos descritos no apêndice 2, na norma ISO 11274 (15) ou numa norma equivalente da UE.

13. Se o produto químico em estudo for aplicado na superfície do solo ou misturado neste sem utilizar água, a quantidade final de água pode ser misturada no solo artificial durante a preparação deste último. Se o produto químico em estudo for misturado no solo juntamente com água, a água pode ser adicionada juntamente com o produto químico em estudo (ver ponto 19).

14. O teor de humidade do solo é determinado no início e no final do ensaio, em conformidade com a norma ISO 11465 ou uma norma equivalente da UE (16), sendo o pH do solo determinado em conformidade com o apêndice 3, com a norma ISO 10390 (13) ou com uma norma equivalente da UE. As

▼M6

determinações devem ser realizadas com uma amostra de controlo do solo e uma amostra de solo com cada concentração de ensaio. O pH do solo não deve ser ajustado quando se sujeitem a ensaio produtos químicos ácidos ou básicos. O teor de humidade deve ser monitorizado durante o ensaio, mediante pesagem periódica dos recipientes (ver pontos 26 e 30).

Seleção e preparação dos animais para ensaio

15. As espécies utilizadas no ensaio são a *Eisenia fetida* ou a *Eisenia andrei* (1) (2). O ensaio deve iniciar-se com vermes adultos, providos de clitelo, com idade entre dois meses e um ano. Os vermes devem ser selecionados a partir de uma cultura sincronizada com estrutura etária relativamente homogénea (apêndice 4). Em cada grupo de ensaio, a idade dos indivíduos não deve diferir em mais de quatro semanas.

16. Os vermes selecionados devem ser aclimatados durante, pelo menos, um dia ao tipo de substrato de solo artificial a utilizar no ensaio. Durante este período, os vermes devem ser alimentados com o alimento a utilizar no ensaio (ver pontos 31 a 33).

17. Pesam-se individualmente grupos de 10 vermes, que se colocam de forma aleatória nos recipientes no início do ensaio. Os vermes são lavados com água desionizada antes da pesagem; remove-se o excesso de água colocando os vermes por breves instantes sobre papel de filtro. A massa húmida de cada verme deve ser da ordem de 250 a 600 mg.

Preparação das concentrações de ensaio

18. Podem utilizar-se dois métodos para a aplicação do produto químico em estudo: mistura do produto químico no solo (ver pontos 19 a 21) ou aplicação na superfície do solo (ver pontos 22 a 24). A seleção do método adequado depende da finalidade do ensaio. Em geral, recomenda-se a mistura do produto químico no solo. No entanto, pode ser necessário utilizar processos de aplicação compatíveis com as práticas agrícolas comuns (por exemplo, pulverização de formulações líquidas ou utilização de formulações pesticidas especiais, como grânulos ou formulações para tratamento de sementes). Os solventes utilizados como auxiliares do tratamento do solo com o produto químico em estudo devem ser selecionados em função da sua baixa toxicidade para as minhocas, devendo o procedimento de ensaio incluir um controlo adequado do solvente (ver ponto 27).

Mistura do produto químico no solo

Produtos químicos solúveis em água

19. Imediatamente antes do início do ensaio, prepara-se uma solução do produto químico em água desionizada numa quantidade suficiente para todos os replicados de uma concentração. Pode ser necessário um cossolvente para facilitar a preparação da solução de ensaio. É conveniente preparar a quantidade de solução necessária para atingir o teor de humidade final (40 a 60 % da capacidade máxima de retenção de água). A solução é misturada cuidadosamente com o substrato do solo antes da sua introdução num recipiente de ensaio.

Produtos químicos insolúveis em água

20. O produto químico em estudo é dissolvido num pequeno volume de um solvente orgânico adequado (por exemplo, acetona) e, em seguida, aspergido ou misturado numa pequena quantidade de areia de quartzo fina. Seguidamente, o solvente é eliminado por evaporação num exaustor durante, pelo menos, alguns minutos. A areia tratada é então misturada cuidadosamente com o solo artificial previamente humedecido. Adiciona-se a quantidade de água desionizada necessária para atingir um teor final de humidade de 40 a 60 % da capacidade máxima de retenção de água, misturando bem. O solo está então pronto para ser colocado nos recipientes de ensaio. Dado que alguns solventes podem ser tóxicos para as minhocas, há que tomar os devidos cuidados.

▼M6

Produtos químicos insolúveis em água e em solventes orgânicos

21. Prepara-se uma mistura constituída por 10 g de areia de quartzo industrial finamente moída e a quantidade do produto químico em estudo necessária para obter a concentração de ensaio no solo. A mistura é homogeneizada no solo artificial previamente humedecido. Adiciona-se a quantidade de água desionizada necessária para atingir um teor final de humidade de 40 a 60 % da capacidade máxima de retenção de água, misturando bem. O solo está então pronto para ser colocado nos recipientes de ensaio.

Aplicação do produto químico na superfície do solo

22. O solo é tratado após a adição dos vermes. Os recipientes de ensaio são enchidos com o substrato de solo humedecido e colocam-se as minhocas, previamente pesadas, na superfície. Em geral, os vermes saudáveis começam de imediato a enterrar-se no substrato, pelo que quaisquer espécimes que permaneçam à superfície ao cabo de 15 minutos são considerados anómalos e devem ser substituídos. Se houver substituição de vermes, devem-se pesar quer os substituintes quer os substituídos, para se conhecer o peso total do grupo de vermes vivos expostos e o peso total do recipiente com vermes no início do ensaio.

23. Procede-se à aplicação do produto químico em estudo. Esta não deve ter lugar na meia hora subsequente à introdução das minhocas (ou se houver vermes na superfície do solo), de modo a evitar qualquer exposição direta ao produto por contacto com a pele. Se o produto químico em estudo for um pesticida, pode justificar-se aplicá-lo na superfície do solo por pulverização. O produto químico em estudo deve ser aplicado na superfície do solo de forma tão uniforme quanto possível, por recurso a um dispositivo adequado de pulverização à escala laboratorial que simule a pulverização em campo. Antes da aplicação, a tampa do recipiente de ensaio deve ser removida e substituída por um invólucro que proteja da pulverização as paredes laterais do recipiente. O invólucro pode ser constituído por um recipiente de ensaio ao qual se removeu a base. A aplicação deve ter lugar a uma temperatura de 20 ± 2 ?C e, no caso das soluções aquosas, emulsões e dispersões em água, a uma taxa compreendida entre 600 e 800 $\mu l/m^2$. Esta taxa deve ser verificada por recurso a uma técnica de calibração adequada. As formulações especiais, como grânulos ou formulações para tratamento de sementes, devem ser aplicadas de modo compatível com a utilização para fins agrícolas.

24. Os recipientes de ensaio devem ser deixados descobertos durante uma hora, para permitir a evaporação de qualquer solvente volátil utilizado na aplicação do produto químico em estudo. Devem tomar-se os devidos cuidados para que, nesse período, nenhum espécime saia dos recipientes de ensaio.

PROCEDIMENTO

Grupos de ensaio e grupos de controlo

25. Recomenda-se uma carga de 10 minhocas em 500-600 g de massa seca de solo artificial (ou seja, 50-60 g de solo por minhoca). Se se utilizarem quantidades maiores de solo, como no caso do ensaio de pesticidas com modos especiais de aplicação (por exemplo, formulações para tratamento de sementes), deve manter-se a carga de 50-60 g de solo por verme aumentando o número de indivíduos. Preparam-se 10 vermes por cada recipiente de controlo e de exposição. Os vermes são lavados com água e limpa e colocados sobre papel absorvente durante um curto período, para permitir a remoção da água em excesso.

26. A fim de evitar erros sistemáticos na distribuição dos vermes nos recipientes de ensaio, a homogeneidade da população a testar deve ser determinada por pesagem individual de 20 indivíduos colhidos aleatoriamente da população-fonte. Uma vez assegurada a homogeneidade, selecionam-se e pesam-se lotes de vermes, a distribuir aleatoriamente pelos recipientes de ensaio. Após a adição dos vermes, pesa-se cada recipiente de ensaio, para assegurar

▼M6

a existência de um peso inicial que pode servir de base para a monitorização do teor de humidade do solo durante todo o ensaio, como descrito no ponto 30. Os recipientes de ensaio são cobertos de acordo com o ponto 9 e colocados na câmara de ensaio.

27. Preparam-se amostras-controlo adequadas para cada um dos métodos de aplicação do produto químico em estudo descritos nos pontos 18 a 24. Seguem-se os procedimentos descritos para preparar os controlos, exceto que não é adicionado o produto químico em estudo. Assim, quando necessário, são aplicadas aos controlos solventes orgânicos, areia de quartzo ou outros veículos, em concentrações ou quantidades compatíveis com as utilizadas nas amostras de ensaio. Se se adicionar um solvente ou outro veículo ao produto químico em estudo, deve preparar-se e submeter-se a ensaio uma amostra-controlo suplementar de controlo sem o veículo ou o produto químico em estudo, de forma a garantir que o veículo não influi nos resultados.

Condições de realização do ensaio

28. A temperatura de ensaio é de 20 ± 2 °C. O ensaio é efetuado em ciclos luz/obscuridade (de preferência, 16 horas de luz e 8 horas de obscuridade), com iluminação de 400 a 800 lux na zona dos recipientes de ensaio.

29. Os recipientes não são arejados durante o ensaio, mas a conceção das suas coberturas deve permitir trocas gasosas, embora limitando a evaporação da humidade (ver ponto 9).

30. O teor em água do substrato edáfico nos recipientes de ensaio é mantido ao longo do ensaio, através da repesagem periódica dos recipientes de ensaio (excluindo as coberturas). As perdas são compensadas, na medida do necessário, com água desionizada. O teor de água não deve variar mais de 10 % em relação ao início do ensaio.

Alimentação

31. Considera-se aceitável qualquer alimento que se tenha revelado adequado para, no mínimo, manter o peso dos vermes durante o ensaio. A experiência demonstra que a farinha de aveia e o estrume de cavalo ou bovino constituem alimentos adequados. Devem realizar-se controlos para garantir que os bovinos ou equinos que produzem o estrume não são alvo de tratamento com medicamentos ou produtos químicos, como promotores de crescimento, nematicidas ou produtos veterinários semelhantes que possam afetar os vermes durante o ensaio. Recomenda-se a utilização de estrume de bovino recolhido, dado a experiência mostrar que o estrume disponível no comércio sob a forma de adubo para jardinagem pode ter efeitos adversos nos vermes. O estrume deve ser seco ao ar, finamente triturado e pasteurizado antes da utilização.

32. Para garantir a qualidade adequada, cada novo lote de alimentos deve ser fornecido a uma cultura de vermes não utilizada no ensaio antes da sua utilização neste. O crescimento e a produção de casulos não devem ser reduzidos em comparação com os vermes mantidos num substrato desprovido do novo lote de alimentos, conforme descrito no método de ensaio C.8 (4).

33. O alimento é fornecido pela primeira vez no dia seguinte ao da colocação dos vermes e da aplicação do produto químico no solo. Espalham-se na superfície do solo de cada recipiente cerca de 5 g de alimento, que se humidificam com água desionizada (5 ml a 6 ml por recipiente). Posteriormente, durante o período de ensaio de 4 semanas, o alimento é fornecido

▼M6

uma vez por semana. Se o alimento não for consumido, a ração deve ser reduzida, de modo a evitar o desenvolvimento de fungos e bolores. Os adultos são retirados do solo no 28.º dia de ensaio. Colocam-se então mais 5 g de alimento em cada recipiente de ensaio. Não é fornecida qualquer alimentação nas restantes 4 semanas do ensaio.

Seleção das concentrações de ensaio

34. O conhecimento prévio da toxicidade do produto químico em estudo (por exemplo, com base num ensaio de toxicidade aguda (4) e/ou em ensaios de determinação da gama de concentrações) constitui um bom contributo para a seleção das concentrações de ensaio adequadas. Se necessário, efetua-se um ensaio de determinação da gama de concentrações com, por exemplo, cinco concentrações do produto químico em estudo, respetivamente 0,1, 1,0, 10, 100 e 1 000 mg/kg (massa seca do solo). Basta um replicado para cada ensaio de tratamento e de controlo. A duração do ensaio de determinação da gama de concentrações é de duas semanas, sendo a mortalidade avaliada no final do ensaio.

Conceção experimental

35. Uma vez que não é possível prescrever um único parâmetro estatístico, o presente método de ensaio prevê a determinação dos parâmetros NOEC e EC_x. É provável que a NOEC seja exigida pelas autoridades reguladoras num futuro previsível. Num futuro próximo, pode preconizar-se uma utilização mais vasta da EC_x, com base em considerandos de natureza estatística e ecológica. Portanto, propõem-se três conceções, baseadas nas recomendações resultantes do estudo interlaboratorial comparativo de um método de reprodução com enquitreídeos (17).

36. Na escolha da gama de concentrações, importa ter presente o seguinte:

— Para a determinação da NOEC, devem submeter-se a ensaio, pelo menos, cinco a doze concentrações em progressão geométrica. Recomenda-se a preparação de quatro replicados de cada concentração de ensaio, além de oito controlos. As concentrações devem diferir num fator não superior a 2,0.

— Para a determinação da EC_x (por exemplo: EC_{10}, EC_{50}), recomenda-se um número adequado de concentrações passíveis de induzir, pelo menos, quatro respostas médias com diferenças estatisticamente significativas. Recomenda-se também preparar, pelo menos, dois replicados de cada concentração de ensaio e seis replicados de controlo. O fator de espaçamento pode ser inferior ou igual a 1,8 na gama com efeitos esperados e superior a 1,8 no caso das concentrações mais e menos elevadas.

— Uma abordagem combinada permite a determinação simultânea da NOEC e da EC_x. Devem utilizar-se oito concentrações de ensaio em progressão geométrica. Recomenda-se a preparação de quatro replicados de cada concentração de ensaio, além de oito controlos. As concentrações devem diferir num fator não superior a 1,8.

Duração do ensaio e medições

37. No 28.º dia, observam-se e contam-se os vermes adultos vivos. Registam-se também alterações insólitas de comportamento (por exemplo, incapacidade de se enterrar no solo ou imobilização) e de morfologia (por exemplo, presença de feridas abertas). Seguidamente, retiram-se dos recipientes de ensaio, contam-se e pesam-se todos os vermes adultos. A transferência do solo com os vermes para um recipiente limpo, antes da avaliação, pode facilitar a pesquisa dos indivíduos adultos. Os vermes retirados do solo são lavados com água desionizada antes da pesagem; o excesso de água é removido colocando os vermes por breves instantes sobre papel de filtro. Os vermes não encontrados neste momento devem ser registados como mortos, pressupondo-se que morreram e se decompuseram antes da avaliação.

▼M6

38. O solo que tiver sido retirado dos recipientes é então reposto, sem os vermes adultos mas com os eventuais casulos produzidos. Em seguida, o solo é incubado durante mais quatro semanas nas mesmas condições, exceto que a alimentação tem lugar apenas uma vez, no início desta fase do ensaio (ver ponto 33).

39. No termo do segundo período de 4 semanas, determinam-se, utilizando os procedimentos descritos no apêndice 5, o número de juvenis provenientes da eclosão dos casulos no solo de ensaio e o número de casulos. Registam-se também, ao longo do ensaio, quaisquer sinais de danos apresentados pelos vermes.

Ensaio do limite

40. Se não se observarem efeitos com a concentração mais elevada no ensaio de determinação da gama de concentrações (1 000 mg/kg), o ensaio da reprodução é executado como ensaio do limite, utilizando uma concentração de ensaio de 1 000 mg/kg. Um ensaio do limite representa uma oportunidade para demonstrar que a NOEC para a reprodução é superior à concentração-limite, minimizando, ao mesmo tempo, o número de vermes utilizados no ensaio. Devem utilizar-se oito replicados tanto no caso das amostras de ensaio como das amostras de controlo.

DADOS E RELATÓRIOS

Tratamento dos resultados

41. Embora o apêndice 6 apresente um resumo, o presente método de ensaio não fornece orientações estatísticas definitivas para a análise dos resultados do ensaio.

42. Um dos pontos finais é a mortalidade. As alterações de comportamento (por exemplo, incapacidade de se enterrar no solo; imobilização junto da parede do recipiente) e de morfologia (por exemplo, presença de feridas abertas) entre os adultos devem, porém, ser também registadas, juntamente com a eventual presença de juvenis. Para determinar a LC_{50}, efetua-se em geral uma análise probit (18) ou uma regressão logística. Contudo, nos casos em que este método de análise não for adequado (por exemplo, se tiverem sido utilizadas menos de três concentrações parcialmente letais), podem aplicar-se métodos alternativos. De entre esses métodos, destacam-se as médias móveis (19), o método abreviado de Spearman-Karber (20) e a simples interpolação (por exemplo, média geométrica de LC_0 e LC_{100}, calculada através da raiz quadrada de LC_0 multiplicada por LC_{100}).

43. O outro ponto final é a fecundidade (ou seja, o número de juvenis produzidos). Contudo, tal como no ensaio de determinação da gama de concentrações, todos os outros sinais de nocividade devem constar do relatório final. A análise estatística exige o cálculo da média aritmética $\overline{x}$ e do desvio-padrão para cada amostra de tratamento e cada amostra de controlo, no ensaio de reprodução.

44. Se se tiver realizado uma análise de variância, o desvio-padrão, s, e os graus de liberdade, df, podem ser substituídos, respetivamente, por estimativas agregadas da variância obtidas pelo método ANOVA e pelos graus de liberdade destas, desde que a variância não dependa da concentração. Neste caso, utilizam-se as variâncias simples das amostras de controlo e de tratamento. Esses valores são geralmente calculados por recurso a um *software* estatístico comercial, utilizando os resultados por recipiente como replicados. Caso se afigure razoável proceder ao agrupamento de dados relativos aos controlos negativos e aos controlos com solventes em vez de repetir os ensaios, deve averiguar-se se apresentam diferenças significativas (para definir o ensaio adequado, ver ponto 47 e apêndice 6).

45. A realização de uma análise estatística e de uma inferência mais aprofundadas depende da normalidade da distribuição dos valores relativos aos replicados, bem como da sua homogeneidade em termos de variância.

▼M6

Estimativa da NOEC

46. Deve preferir-se o recurso a ensaios potentes. Para averiguar se os dados exibem uma distribuição aproximadamente normal, devem usar-se, por exemplo, informações provenientes da experiência anterior com estudos interlaboratoriais comparativos ou outros dados históricos. A homogeneidade da variância é mais crítica. A experiência revela que, muitas vezes, a variância aumenta com a média. Nestes casos, a transformação dos dados pode conduzir à homogeneidade da variância. No entanto, essa transformação deve basear-se na experiência adquirida com os dados históricos e não nos dados do ensaio. Com dados homogéneos, devem realizar-se testes *t* múltiplos, como o teste de Williams ($\alpha = 0{,}05$, unilateral) (21) (22) ou, em, certos casos, o teste de Dunnett (23) (24). De notar que, em caso de replicação desigual, os valores *t* do quadro devem ser corrigidos, como sugerido por Dunnett e Williams. Por vezes, devido a uma grande variação, as respostas não exibem aumento ou diminuição regulares. O teste de Dunnett é mais adequado em caso de grandes desvios relativamente à monotonicidade. Se existirem desvios à homogeneidade da variância, pode justificar-se investigar de forma mais aprofundada os possíveis efeitos nesta, de forma a decidir se os testes *t* podem ser executados sem perda apreciável do seu significado (25). Em alternativa, pode executar-se um teste U múltiplo, como, por exemplo, o teste de Bonferroni na versão de Holm (26), ou, se os dados apresentarem homogeneidade da variância mas forem compatíveis com uma relação dose-resposta monótona subjacente, um outro ensaio não paramétrico [por exemplo, de Jonckheere-Terpstra (27) (28) ou de Shirley (29) (30)], geralmente de preferência a testes *t* de variância desigual (ver também o esquema do apêndice 6).

47. Se se realizar um ensaio do limite e se preencherem os pré-requisitos dos procedimentos aplicáveis aos ensaios paramétricos (normalidade, homogeneidade), pode utilizar-se o teste *t* de Student par a par ou, em alternativa, o teste U de Mann-Whitney (31).

Estimativa da EC_x

48. Para o cálculo do valor EC_x, efetua-se uma análise por regressão linear e não linear da média das séries, após a obtenção de uma função adequada dose-resposta. No caso do crescimento dos vermes como resposta contínua, os valores de EC_x podem ser estimados através de uma análise de regressão adequada (32). De entre as funções de dados quantais (mortalidade/sobrevivência e número de descendentes produzidos) adequadas citam-se as funções sigmoide normal, logística e de Weibull, com dois a quatro parâmetros, alguns dos quais se adaptam também às respostas de hormese. Se uma função dose-resposta tiver sido ajustada por análise de regressão linear, deve determinar-se, com base nessa análise, um valor r^2 significativo (coeficiente de determinação) e/ou um declive, para estimar o valor de EC_x, inserindo um valor correspondente a x % da média dos controlos na equação estabelecida por análise de regressão. Os limites dos intervalos de confiança de 95 % são calculados de acordo com Fieller (citado em Finney — referência 18) ou por outros métodos modernos adequados.

49. Em alternativa, a resposta é modelizada em termos de percentagem ou proporção do parâmetro do modelo que é interpretado como a resposta média. Nestes casos, é possível ajustar facilmente aos resultados a curva sigmoide normal (curva logística ou curva de Weibull), por recurso ao método de regressão probit (18). Nestes casos, a função de ponderação tem de ser ajustada para ter em conta as respostas métricas — cf. Christensen (33). No entanto, se tiver ocorrido hormese, a análise probit deve ser substituída por uma função logística de quatro parâmetros ou função de Weibull, no contexto de um método de regressão não linear (34). Se não for possível adaptar os dados a uma função adequada dose-resposta, podem utilizar-se métodos alternativos para estimar o valor EC_x e os seus limites de confiança, como as médias móveis de Thompson (19) e o método abreviado de Spearman-Karber (20).

RELATÓRIO DO ENSAIO

50. O relatório do ensaio deve incluir as seguintes informações:

▼M6

Produto químico em estudo:

— descrição definitiva do produto químico em estudo, lote e número CAS, grau de pureza;

— propriedades do produto químico em estudo (por exemplo, log Kow, hidrossolubilidade, pressão de vapor, constante de Henry (H) e informações sobre o destino e comportamento).

Organismos sujeitos a ensaio

— animais utilizados no ensaio: espécie, nome científico, origem dos organismos e condições de reprodução;

— idade, gama de tamanhos (massa) dos organismos.

Condições de realização do ensaio

— dados sobre a preparação do solo para o ensaio;

— capacidade máxima de retenção de água do solo;

— descrição da técnica utilizada para aplicar no solo o produto químico em estudo;

— informações sobre produtos químicos adjuvantes utilizados para administrar o produto químico em estudo;

— dados de calibração do equipamento de pulverização, se for caso disso;

— descrição completa do método experimental e dos procedimentos;

— dimensão dos recipientes de ensaio e volume de solo utilizado;

— condições de ensaio: intensidade luminosa, duração dos ciclos luz/obscuridade, temperatura;

— descrição do regime alimentar, tipo e quantidade de alimentos utilizados no ensaio, datas de alimentação;

— pH e o teor de humidade do solo no início e no final do ensaio.

Resultados do ensaio:

— mortalidade dos adultos (%) em cada recipiente de ensaio no final das primeiras quatro semanas;

— massa total de adultos no início do ensaio, em cada recipiente;

— alterações no peso corporal dos animais vivos adultos (% do peso inicial) em cada recipiente, após as primeiras quatro semanas do ensaio;

— número de juvenis produzidos em cada recipiente, no final do ensaio;

— descrição dos sintomas ou patologias evidentes ou das alterações comportamentais evidentes;

— resultados obtidos com o produto químico de referência;

— valores de LC_{50}, NOEC e/ou EC_x (por exemplo, EC_{50}, EC_{10}) para a reprodução, caso alguns deles sejam aplicáveis, com intervalos de confiança, e um gráfico do modelo utilizado para o seu cálculo, bem como todas as informações e observações úteis para a interpretação dos resultados;

— representação gráfica da relação dose-resposta;

— resultados de cada recipiente de ensaio;

desvios aos procedimentos descritos no presente método de ensaio e quaisquer ocorrências anómalas durante o mesmo.

REFERÊNCIAS

(1) Jaenicke, J. (1982). «*Eisenia foetida*» is two biological species. Megadrilogica 4, 6-8.

(2) Oien, N. & J. Stenerson (1984). Esterases of earthworm — III. Electrophoresis reveals that *Eisenia foetida* (Savigny) is two species. Comp. Biochem. Physiol. 78c (2), 277-282.

▼**M6**

(3) Kula, C. (1996). Development of a test method on sublethal effects of pesticides on the earthworm species *Eisenia fetida/Eisenia andrei* — comparison of two ringtests. In: Riepert, F., Kula, C. (1996): Development of laboratory methods for testing effects of chemicals and pesticides on collembola and earthworms. Mitt. Biol. Bundesamst. f. Land- Forstwirtsch. Berlin-Dahlem, 320, p. 50-82.

(4) Capítulo C.8 do presente anexo, Toxicidade em relação às minhocas.

(5) ISO (International Organization for Standardization) (1996). Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). *Part 2*: Determination of effects on reproduction, No.11268-2. ISO, Geneve.

(6) ISO (International Organization for Standardization) (1993). Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). *Part 1*: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate, No.11268-1. ISO, Geneve.

(7) SETAC (1998). Advances in Earthworm Ecotoxicology. Sheppard, S.C., Bembridge, J.D., Holmstrup, M., & L. Posthuma, (eds). SETAC Press, 456 pp.

(8) EPA (1996). Ecological effects test guidelines. Earthworm Subchronic Toxicity Test (850.62.00). United States Environmental Protection Agency. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances. EPA712-C-96-167, April 1996.

(9) Bouché, M.B. (1972). Lombriciens de France, Ecologie et systématique. Publication de l'Institut National de la Recherche Agronomique.

(10) Edwards, C.A. (1983). Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms. Report EUR 8714 EN, Commission of European Communities.

(11) Greig-Smith, P.W., H. Becker, P.J. Edwards & F. Heimbach (eds.) (1992). Ecotoxicology of Earthworms. Intercept.

(12) Edwards, C.A. & J. P. Bohlen, (1996). Biology and ecology of Earthworms, 3rd Edition. Chapman & Hall, London.

(13) (ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality — Determination of pH, No. 10390. ISO, Geneve.

(14) Hund-Rinke, K, Römbke, J., Riepert, F. & Achazi R. (2000): Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden mit Hilfe von Regenwurmtests. In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.). Spektrum Verl., Heidelberg. 59-81.

(15) ISO (International Organization for Standardization) (1992). Soil Quality –Determination of water retention characteristics –Laboratory methods, No. 11274. ISO, Geneve.

(16) ISO (International Organization for Standardization) (1993). Soil Quality –Determination of dry matter and water content on a mass basis — Gravimetric method, No. 11465. ISO, Geneve.

(17) Römbke, J. & Th. Moser (1999). Organisation and Performance of an International Ringtest for the validation of the Enchytraeid Reproduction Test. UBA-Texte 4/99, 150+ 223 pp.

▼**M6**

(18) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis (3rd ed.), pp. 19-76. Cambridge Univ. Press.

(19) Finney, D.J. (1978). Statistical Method in Biological Assay — Charles Griffin & Company Ltd, London.

(20) Hamilton, M.A., R.C. Russo & R.V. Thurston. (1977). Trimmed Spearman-Karber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ. Sci. Technol. 11 7 16 714 -719 Correction Environ. Sci. Technol. 12(1998), 417.

(21) Williams, D.A., (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, 103-117.

(22) Williams, D.A., (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, 519-531.

(23) Dunnett, C.W., (1955). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. Amer. Statist. Ass. J. 50, 1096-1121.

(24) Dunnett, C.W., (1964) New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20, 482-491.

(25) Hoeven, N. van der, (1998). Power analysis for the NOEC: What is the probability of detecting small toxic effects on three different species using the appropriate standardized test protocols? Ecotoxicology 7: 355-361

(26) Holm, S., (1979): A simple sequentially rejective multiple test procedure. Scand. J. Statist. 665-70

(27) Jonckheere, A. R. (1954); A Distribution-free k-Sample Test Against Ordered Alternatives, Biometrika 41, 133-145.

(28) Terpstra, T. J. (1952); The Asymptotic Normality and Consistency of Kendall's Test Against Trend, When Ties are Present in One Ranking, Indagationes Math. 14, 327-333.

(29) Shirley, E. A. (1979); The comparison of treatment to control group means in toxicology studies, Applied Statistics 28, 144-151.

(30) Williams, D.A. (1986); A Note on Shirley's Nonparametric Test for Comparing Several Dose Levels with a Zero-Dose Control, Biometrics 42, 183--186.

(31) Sokal, R.R. & F.J. Rohlf. (1981). Biometry. The Principle and practice of statistics in biological research. 2nd edition. W.H. Freeman & Company. New York.

(32) Bruce R.D. & Versteeg D.J. (1992) A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry 11:1485--1494

(33) Christensen, E.R., (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18, 213-221.

(34) Van Ewijk, P.H. & J.A. Hoekstra. (1993). Calculation of the EC50 and its confidence interval when sub-toxic stimulus is present. Ecotox, Environ. Safety. 25, 25-32.

▼M6

Apêndice 1

Definições

Para efeitos do presente método, entende-se por:

Produto químico: uma substância ou mistura.

EC_x (concentração com x % de efeitos): concentração que causa efeitos em x % dos organismos ensaiados num determinado período de exposição, comparativamente ao grupo de controlo. Por exemplo, a EC_{50} é a concentração que se estima que, num ponto final do ensaio, terá efeito em 50 % da população exposta, durante um período de exposição definido. No presente ensaio, as concentrações são expressas em massa do produto químico em estudo por massa seca de solo utilizado no ensaio ou em massa de produto químico em estudo por unidade de superfície do solo.

LC_0 (concentração não letal): concentração de um produto químico em estudo que não mata nenhum dos organismos de ensaio expostos durante um determinado período. No presente ensaio, os valores de LC_0 são expressos em massa do produto químico em estudo por massa seca de solo utilizado.

LC_{50} (concentração letal mediana): concentração de um produto químico em estudo que mata 50 % dos organismos de ensaio expostos num determinado período. No presente ensaio, a LC_{50} é expressa em massa do produto químico em estudo por massa seca de solo utilizado no ensaio ou em massa de produto químico em estudo por unidade de superfície do solo.

LC_{100} (concentração letal total): concentração de um produto químico em estudo que mata 100 % dos organismos de ensaio expostos num determinado período. No presente ensaio, os valores de LC_{100} são expressos em massa do produto químico em estudo por massa seca de solo utilizado.

LOEC (menor concentração com efeito observável): menor concentração do produto químico em estudo que tem um efeito estatisticamente significativo ($p < 0,05$). No presente ensaio, a LOEC é expressa em massa do produto químico em estudo por massa seca de solo utilizado ou em massa de produto químico em estudo por unidade de superfície do solo. Em geral, todas as concentrações de ensaio superiores à LOEC devem apresentar um efeito estatisticamente diferente das amostras de controlo. Quaisquer desvios em relação às condições referidas devem ser justificados no relatório de ensaio.

NOEC (concentração sem efeitos observáveis): a concentração mais elevada do produto químico em estudo imediatamente abaixo da LOEC à qual não se observa nenhum efeito. Neste ensaio, a concentração NOEC não tem nenhum efeito com significância estatística ($p < 0,05$) num determinado período de exposição, comparativamente ao grupo de controlo.

Taxa de reprodução: Média do número de juvenis produzidos por um dado número de vermes adultos, no período de ensaio.

Produto químico em estudo: qualquer substância ou mistura sujeita a ensaio segundo o presente método.

▼M6

Apêndice 2

Determinação da capacidade máxima do solo para reter água (capacidade máxima de retenção de água)

O método que se segue foi considerado adequado para determinar a capacidade máxima de retenção de água. É descrito no anexo C da norma ISO DIS 11268-2 (1).

Recolher uma determinada quantidade (por exemplo, 5 g) de substrato do solo de ensaio com o auxílio de um instrumento adequado (tubo Auger, etc.). Cobrir o fundo do tubo com um pedaço de papel de filtro e, após o enchimento com água, introduzi-lo num suporte de banho-maria. O tubo deve ser submergido gradualmente, até que o nível de água se situe acima do topo da camada de solo. Deixar o tubo no banho-maria durante cerca de três horas. Dado não ser possível reter toda a água absorvida por capilaridade, deve deixar-se a amostra de solo escorrer durante duas horas, colocando o tubo num leito de areia de quartzo finamente moída e muito húmida, contido num recipiente coberto (para evitar a secagem). Seguidamente, pesar a amostra, seca até massa constante, a 105 °C. A capacidade de retenção de água (WHC) é calculada do seguinte modo:

$$\text{WHC (em \% da massa seca)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

em que:

S = substrato saturado de água + massa do tubo + massa do papel de filtro

T = tara (massa do tubo + massa do papel de filtro)

D = massa seca de substrato

REFERÊNCIAS:

(1) ISO (Organização Internacional de Normalização) (1996). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, No.11268-2. ISO, Geneve.

▼**M6**

Apêndice 3

Determinação do pH do solo

O seguinte método de determinação do pH de uma amostra de solo baseia-se na descrição constante da norma ISO 10390 (Qualidade do solo — Determinação de pH).

Uma determinada quantidade de solo é seca à temperatura ambiente durante, pelo menos, 12 horas. A uma suspensão de solo que contenha, pelo menos, 5 g de solo adiciona-se cinco vezes o seu volume de uma solução 1 M de cloreto de potássio (KCl) de qualidade analítica ou de uma solução 0,01 M de cloreto de cálcio ($CaCl_2$) também de qualidade analítica. A suspensão é agitada vigorosamente durante cinco minutos. Após a agitação, deixa-se a suspensão em repouso durante, pelo menos, 2 horas, mas não mais de 24 horas. O pH da fase líquida é então medido por recurso a um medidor de pH, calibrado, antes de cada medição, com uma série adequada de soluções-tampão (por exemplo, pH 4,0 e 7,0).

REFERÊNCIAS:

(1) ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality — Determination of pH, No. 10390. ISO, Geneve.

▼M6

Apêndice 4

Cultura de *Eisenia fetida* e *Eisenia andrei*

A cultura deve ser efetuada, de preferência, numa câmara climatizada a 20 °C ± 2 °C. A esta temperatura, com uma alimentação suficiente, os vermes tornam-se adultos ao termo de 2 a 3 meses.

Ambas as espécies podem ser criadas numa vasta gama de resíduos de origem animal. O meio de cultura recomendado é uma mistura 50:50 de estrume de equino ou de bovino com turfa. Devem realizar-se controlos para garantir que os bovinos ou equinos que produzem o estrume não são alvo de tratamento com medicamentos ou produtos químicos, como promotores de crescimento, nematicidas ou produtos veterinários semelhantes que possam afetar os vermes durante o ensaio. Recomenda-se a utilização de estrume de origem «biológica», dado a experiência mostrar que o estrume disponível no comércio sob a forma de adubos para jardinagem pode ter efeitos adversos nos vermes. O meio deve ter um pH de 6 a 7 (ajustado com carbonato de cálcio) e baixa condutividade iónica (menos de 6 mS/cm ou 0,5 % de concentração salina) e não deve estar excessivamente contaminado com amoníaco ou urina. O substrato deve estar húmido, mas não encharcado. São adequadas caixas de cultura de 10 a 50 litros.

A melhor forma de obter minhocas de idade e tamanho (massa) normalizados consiste em iniciar a cultura com casulos. Uma vez iniciada, a cultura é mantida mediante a colocação de minhocas adultas, durante 14 a 28 dias, numa caixa de reprodução com substrato fresco, para permitir a produção de novos casulos. Retiram-se os adultos e utilizam-se os juvenis eclodidos dos casulos como base para a próxima cultura. Os vermes são alimentados permanentemente com resíduos animais e transferidos periodicamente para um substrato fresco. A experiência demonstra que o estrume de bovino ou de equino moído e a farinha de aveia constituem alimentos adequados. Deve garantir-se que os bovinos ou equinos que produzem o estrume não são alvo de tratamento com medicamentos ou produtos químicos, como promotores de crescimento, que possam afetar os vermes em culturas a longo prazo. Os vermes eclodidos dos casulos são utilizados nos ensaios entre 2 e 12 meses de idade, altura em que se consideram adultos.

Os vermes podem ser considerados saudáveis se se movimentarem através do substrato, não tentarem abandoná-lo e se reproduzirem continuamente. O substrato acusa exaustão se os vermes se deslocarem muito lentamente e tiverem a extremidade posterior amarela, caso em que se recomenda a aplicação de substrato fresco e/ou uma redução da densidade populacional.

▼M6

Apêndice 5

Técnicas para a contagem de vermes juvenis eclodidos dos casulos

A triagem manual de vermes do substrato edáfico é muito morosa. Recomendam-se, por isso, dois métodos alternativos:

a) Os recipientes de ensaio são colocados em banho-maria a uma temperatura inicial de 40 °C, com aumento até 60 °C. Após um período de cerca de 20 minutos, os vermes juvenis devem aparecer à superfície do solo, podendo então ser facilmente retirados e contados.

b) O solo utilizado no ensaio é lavado num crivo, por recurso ao método desenvolvido por van Gestel *et al.* (1), desde que a turfa e o estrume ou a farinha de aveia adicionados ao solo sejam finamente moídos. Sobrepõem-se dois crivos com 0,5 mm de malha e diâmetro de 30 cm. O conteúdo de um recipiente de ensaio é lavado nos crivos sob um fluxo forte de água da torneira; os vermes jovens e os casulos são retidos principalmente no crivo superior. É importante notar que toda a superfície do crivo superior deve ser mantida húmida durante a operação, para que os juvenis flutuem numa película de água que os impeça de passar através dos poros. Os melhores resultados obtêm-se utilizando uma cabeça de chuveiro.

Uma vez lavado todo o substrato, os juvenis e os casulos podem ser transferidos, por enxaguamento, do crivo superior para um recipiente. Deixa-se repousar o conteúdo do recipiente, de forma a permitir a flutuação dos casulos vazios à superfície da água, enquanto os casulos cheios e os vermes juvenis se precipitam para o fundo. A água pode, então, ser decantada, transferindo-se os juvenis e os casulos para uma placa de Petri com um pouco de água. Retiram-se os vermes para contagem por meio de uma agulha ou de um par de pinças.

A experiência demonstra que o método a) é mais adequado para a extração de juvenis que possam ser lavados num crivo de 0,5 mm.

Deve determinar-se sempre a eficiência do método utilizado para remover os vermes (e os eventuais casulos) do substrato edáfico. Se os juvenis forem retirados por triagem manual, é aconselhável realizar duas vezes a operação com todas as amostras.

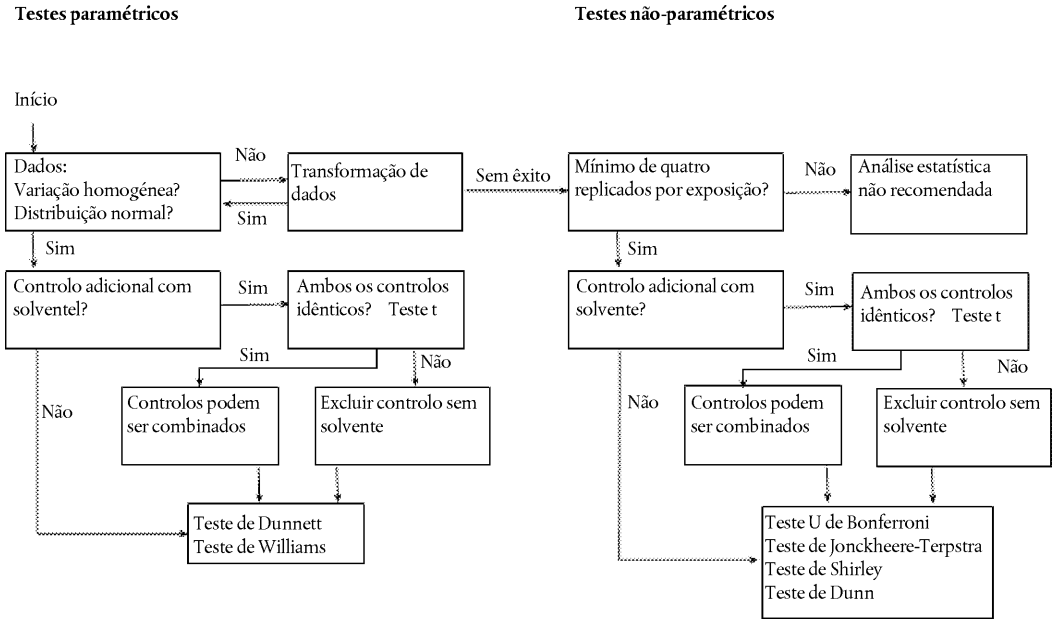
REFERÊNCIAS:

(1) Van Gestel, C.A.M., W.A. van Dis, E.M. van Breemen, P.M. Sparenburg (1988). Comparison of two methods determining the viability of cocoons produced in earthworm toxicity experiments. Pedobiologia 32:367-371.

▼**M6**

Apêndice 6

Resumo da avaliação estatística dos dados (determinação da NOEC)



▼M6

C.34. DETERMINAÇÃO DA INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DE BACTÉRIAS ANAERÓBIAS — REDUÇÃO DA PRODUÇÃO DE GÁS A PARTIR DE LAMAS DIGERIDAS EM CONDIÇÕES DE ANAEROBIOSE

INTRODUÇÃO

1. O presente método é equivalente ao *Test Guideline* (TG) 224 (2007) da OCDE. Os produtos químicos descarregados nos meios aquáticos atingem as zonas aeróbia e anaeróbia, onde podem ser degradados e/ou podem inibir a atividade bacteriana; em certos casos, podem permanecer na zona anaeróbia, sem serem degradados, durante décadas ou ainda mais tempo. Nos processos de tratamento de águas residuais, o primeiro passo (primeira eliminação), é aeróbio no líquido sobrenadante e anaeróbio na lama depositada. Este tratamento é seguido de um segundo passo em que se estabelece uma zona aeróbia no tanque de arejamento de lamas ativadas e uma zona anaeróbia nas lamas depositadas no tanque de decantação secundário. A lama presente nestes dois tratamentos é, normalmente, sujeita a um tratamento anaeróbio, produzindo metano e dióxido de carbono, os quais são comumente utilizados na produção de eletricidade. No meio ambiente, os produtos químicos que se depositam nos sedimentos de baías, estuários e no mar ficam retidos indefinidamente nessas zonas anaeróbias, se não forem biodegradados. Grandes quantidades de certos produtos químicos depositam-se nessas zonas devido às suas propriedades físicas, como uma baixa solubilidade em água, elevada capacidade de adsorção em sólidos em suspensão e incapacidade de serem biodegradados em condições de aerobiose.

2. Embora seja desejável que os produtos químicos descarregados no meio ambiente sejam biodegradáveis, quer em condições de aerobiose quer de anaerobiose, é essencial que não inibam a atividade dos microrganismos presentes nessas zonas. No Reino Unido, observaram-se alguns casos de completa inibição da produção de metano devido a descargas industriais de pentaclorofenol, obrigando à remoção bastante dispendiosa das lamas e à importação de lamas digeridas saudáveis de instalações vizinhas. Têm-se registado casos menos graves de toxicidade por outros produtos químicos, incluindo hidrocarbonetos alifáticos halogenados (produtos de lavagem a seco) e detergentes, que originaram prejuízos significativos na eficiência da digestão.

3. Apenas um método C.11 (1) se refere à inibição da atividade bacteriana (respiração de lamas ativadas), e avalia o efeito de produtos químicos na taxa de absorção de oxigénio na presença de um substrato. Este método é largamente utilizado na prevenção de possíveis efeitos nocivos de produtos químicos no tratamento aeróbio de águas residuais, bem como como indicador das concentrações não inibitórias de produtos químicos, que podem ser utilizadas nos vários testes de biodegradabilidade. O método C.43 (2) oferece uma oportunidade limitada para determinar a toxicidade de produtos químicos na produção de gás por lamas anaeróbias, diluídas 10 vezes em relação à sua concentração normal de sólidos, para permitir a precisão necessária à avaliação da biodegradação percentual. E porque as lamas diluídas podem ser mais sensíveis a produtos químicos inibitórios, o grupo ISO decidiu preparar um método utilizando lamas não diluídas. Foram analisados, pelo menos, três textos (Dinamarca, Alemanha e Reino Unido), tendo finalmente sido elaboradas duas normas ISO, uma utilizando lamas não diluídas, ISO 13 641-1 83) e outra utilizando uma diluição de 100x para as lamas, ISO 13 641-2 (4), para responder aos tipos de lodos e sedimentos que apresentam baixas concentrações de populações bacterianas. Ambos os métodos foram sujeitos a um teste de intercalibração (5): a primeira norma foi bem aceite, mas tem havido desacordo quanto à segunda. O Reino Unido considera que, dado uma proporção significativa dos participantes referir uma pequena ou nenhuma produção de gás — devido, em parte, ao facto de percentagem de espaço de gás ser muito elevada (até 75 %) para permitir uma sensibilidade aceitável -, este protocolo necessita de uma investigação mais aprofundada.

4. Trabalhos realizados anteriormente no Reino Unido (6) (7) descrevem um método manométrico que utiliza, como substrato, lamas digeridas não diluídas e lodo de esgoto em bruto, em frascos de 500 ml; contudo, o aparelho era pesado e o cheiro do lodo tornava o trabalho desagradável. Mais tarde, Shelton e Tiedje (8) apresentaram um aparelho mais conveniente e leve,

▼M6

desenvolvido por Batterrsby e Wilson (9) e utilizado por Wilson *et al.* (10) com sucesso. Kawahara *et al.* (11) prepararam com sucesso em laboratório outros padrões de lamas, para utilizar em testes de biodegradabilidade anaeróbica e inibição de uma série de produtos químicos. O lodo de esgoto em bruto como substrato foi, também, substituído nos testes por lodo anaeróbio diluído 100x ou por lamas, sedimentos, etc., de baixa atividade bacteriana.

5. Este método pode fornecer informações úteis para a antevisão do efeito do produto químico em estudo na produção de gás em digestores anaeróbios. No entanto, só realizando testes e simulando condições em digestores, se pode indicar se há adaptação dos microrganismos ao produto químico em estudo ou se o produto químico, que será absorvido ou adsorvido pelo lodo, pode dar origem a concentrações tóxicas que ultrapassem a duração permitida pelo presente teste.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

6. Alíquotas de uma mistura de lamas digeridas em condições de anaerobiose (20 g/l a 40 g/l de sólidos totais) e uma solução do substrato degradável são incubados sozinhos e simultaneamente com uma série de concentrações do produto químico em estudo, em garrafas vedadas, durante três dias. A quantidade de gás produzido (metano e dióxido de carbono) é medida pelo aumento de pressão (Pa) nas garrafas. A inibição percentual na produção do gás para as várias concentrações do produto químico em estudo é calculada a partir das quantidades produzidas nas garrafas do controlo e da experiência em si. A EC_{50} e outras concentrações pertinentes são calculadas a partir de curvas traçadas com a inibição percentual em função da concentração do produto químico ou, mais comumente, em função do seu logaritmo.

INFORMAÇÕES SOBRE O PRODUTO QUÍMICO EM ESTUDO

7. Os produtos químicos em estudo devem ser, normalmente, utilizados na sua forma química mais pura, pois algumas impurezas presentes, como os clorofenóis, podem ser mais tóxicos do que o próprio produto químico em estudo. No entanto, deve ponderar-se a necessidade de utilizar o produto químico na forma comercial disponível. Não se recomenda a utilização rotineira de produtos preparados, mas, no caso de produtos químicos pouco solúveis, pode constituir o melhor método. Devem ser conhecidas as propriedades do produto químico em estudo, nomeadamente a sua solubilidade em água e em alguns solventes orgânicos, a pressão de vapor de água, o coeficiente de adsorção, a hidrólise e biodegradabilidade em condições de anaerobiose.

APLICABILIDADE DO MÉTODO

8. O presente método é válido para produtos químicos solúveis e insolúveis em água, incluindo produtos voláteis. Devem tomar-se cuidados particulares com materiais de baixa solubilidade em água (12) e alta volatilidade. Podem, também, ser utilizados inóculos de outros locais anaeróbios, como lodos, solos saturados e sedimentos. Os sistemas bacterianos anaeróbios que tenham sido previamente expostos a produtos químicos tóxicos podem ser adaptados para manterem a sua atividade na presença de produtos químicos xenobióticos. Estes inóculos podem apresentar uma elevada tolerância aos produtos químicos em estudo quando comparados com inóculos obtidos em sistemas que não tenham sofrido essa adaptação.

PRODUTOS QUÍMICOS DE REFERÊNCIA

9. Para verificar o procedimento, um produto químico de referência é testado em paralelo em recipientes apropriados como parte da experiência: o 3,5--diclorofenol mostrou ser um bom inibidor da produção anaeróbia de gás, assim como para o consumo de oxigénio por lamas ativadas e outras reações bioquímicas. Outros produtos químicos mostraram se mais efetivos na inibição da produção de metano que o 3,5-diclorofenol — é o caso, nomeadamente, do bis-tiocianato de metileno (MBT) e do pentaclorofenol –, mas os resultados obtidos com estes produtos químicos ainda não foram validados. O pentaclorofenol não é recomendado, pois não se encontra disponível na forma pura.

▼M6

REPRODUTIBILIDADE DOS RESULTADOS

10. Um teste interlaboratorial mostrou haver, entre os 10 participantes, uma reprodutibilidade muito baixa nos valores de EC_{50} para o 3,5-diclorofenol e o 2-bromoetanossulfonato (a concentração do primeiro variou entre 32 mg/l e 502 mg/l e a do segundo entre 220 mg/l e 2 190 mg/l).

Número de laboratórios	mg/l			mg/g de lama		
	Média	Desvio-padrão	Coeficiente de variação (%)	Média	Desvio-padrão	Coeficiente de variação (%)
	3,5-Diclorofenol					
10	153	158	103	5	4,6	92
	Ácido 2-bromoetanossulfónico					
10	1 058	896	85	34	26	76

Dados de EC_{50} do teste interlaboratorial — lamas não diluídas

11. Os elevados coeficientes de variação entre os laboratórios refletem, em grande medida, as diferenças de sensibilidade dos microrganismos presentes nas lamas devido a uma pré-exposição ou à não-exposição ao produto químico em estudo ou outros produtos químicos afins. A precisão do valor de EC_{50}, com base na concentração de lamas, revelou-se pouco melhor que o valor «volumétrico» (mg/l). Os três laboratórios que comunicaram os valores mais precisos para o 3,5-diclofenol apresentaram os coeficientes de variação mais baixos (22, 9, e 18 %, respetivamente, para a EC_{50}, expressa em mg/g) do que a média de todos os laboratórios. As médias individuais dos três laboratórios foram 3,1, 3,2 e 2,8 mg/g, respetivamente. Os coeficientes de variação mais baixos e aceitáveis entre os laboratórios comparados com os coeficientes de variação mais elevados entre os laboratórios, nomeadamente, 9-22 % e 92 %, indicam existirem diferenças significativas nas propriedades das lamas estudadas.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Equipamento

12. Utiliza-se o equipamento usual de laboratório, nomeadamente o seguinte:

a) Incubadora — à prova de faíscas e com controlo de temperatura (35 °C ± 2 °C);

b) Recipientes de vidro resistentes à pressão de dimensões apropriadas ([1]), cada um revestido com uma membrana à prova de gás que possa resistir a pressões entre 2 bar e 2 × 105 Pa (para revestimento utilizar, por exemplo, PTFE — politetrafluoretileno). Recomendam-se, em especial, frascos de soro com 125 ml, com um volume real de 160 ml, vedados com membranas ([2]) e anéis de alumínio; podem, também, ser utilizadas garrafas com um volume total de 0,1 e 1 l;

([1]) O volume recomendado é de 0,1 litros a 1 litro.

([2]) A utilização de rolhas de silicone à prova de gás é o mais recomendável. Recomenda-se também que as rolhas sejam testadas — principalmente as rolhas de borracha de butilo —, porque algumas rolhas disponíveis comercialmente não são suficientemente estanques ao metano e outras não se mantêm apertadas quando são atravessadas por agulhas, como é necessário neste teste.

— no caso de produtos químicos voláteis, são recomendadas e devem ser utilizadas membranas à prova de gás (algumas membranas, disponíveis comercialmente, são relativamente finas — menos de 0,5 cm — e não são estanques quando se introduz a agulha);

— se os produtos químicos em estudo não forem voláteis, são recomendadas rolhas de borracha de butilo (com 1 cm), pois mantêm-se estanques aos gases mesmo depois de espetadas com a agulha;

— antes do teste, recomenda-se que as membranas e as rolhas sejam cuidadosamente verificadas para averiguar se se mantêm estanques aos gases mesmo depois de espetadas com a agulha.

▼M6

c) Medidor de pressão de precisão [1], com agulha acoplada

A produção de gás total (metano mais dióxido de carbono) medido com um medidor de pressão adaptado para permitir medições e ventilação do gás produzido. Um exemplo de um aparelho adequado é um medidor de pressão de mão ligado a uma seringa com agulha; uma válvula de gás com três vias facilita a libertação da pressão em excesso (apêndice 1). É necessário manter o volume da tubagem do transdutor e da válvula o mais pequeno possível, para que os erros introduzidos pelo volume do equipamento, que não é contabilizado, sejam insignificantes;

d) Recipientes isolantes para transporte das lamas digeridas;

e) Válvulas de gás de três vias;

f) Crivo com malha de 1 mm quadrado;

g) Reservatório para as lamas digeridas, um vidro ou uma garrafa de polietileno com capacidade de 5 litros, equipado com um agitador e com a possibilidade de introduzir azoto gasoso (ver parágrafo 13) no volume livre de líquido;

h) Filtros de membrana (0,2 μm), para esterilizar o substrato;

i) Microsseringas, para a ligação do transdutor de pressão [ver ponto 12, alínea c)] ao volume livre de líquido [ver ponto 12, alínea b)]; também, para adicionar líquidos insolúveis às garrafas, se for esse o caso em estudo;

j) Câmara de fluxo laminar com luvas, opcional mas recomendada, com uma ligeira pressão positiva de azoto.

Reagentes

13. Utilizar sempre reagentes de qualidade analítica. O azoto gasoso utilizado durante todo o teste deve ser de elevada pureza, com um teor de oxigénio inferior a 5μ/l.

Água

14. Se for necessário realizar alguma diluição, utilizar água desionizada previamente arejada. Não é necessário efetuar controlos analíticos dessa água, mas deve garantir-se a verificação regular do aparelho da água desionizada. Utilizar também água desionizada na preparação das soluções-mãe. Antes da adição do inóculo anaeróbio a qualquer solução ou diluição do material em estudo, importa assegurar que estas estão isentas de oxigénio. Para tal, borbulhar azoto gasoso na água com de diluição (ou nas próprias diluições) durante 1 h, antes de adicionar o inóculo ou, alternativamente, aquecer a água à fervura e deixar arrefecer à temperatura ambiente numa atmosfera isenta de oxigénio.

Lamas para digestão

15. Recolher lamas digeridas num digestor de uma estação de tratamento de esgotos ou, alternativamente, recolher as lamas de um digestor laboratorial de esgotos de origem doméstica. Informação prática sobre lamas de digestores de laboratório pode ser encontrada na bibliografia (11). Caso se pretenda utilizar um inóculo diferente, devem preferir-se lamas digeridas de

[1] O medidor deve ser verificado e calibrado regularmente de acordo com as instruções do fabricante. Se o medidor de pressão for um modelo mais completo — por exemplo, fechado com uma membrana de aço — a calibração não é necessária. A precisão da calibração no laboratório pode ser verificada utilizando um padrão a 1×10^5 Pa. Quando a medição é efetuada correctamente, a linearidade deve manter-se inalterada. Se forem utilizados outros medidores (sem certificado de calibração fornecido pelo fabricante), recomenda-se efetuar a conversão dos intervalos de concentrações de uma forma mais regular (apêndice 2).

▼M6

uma estação de tratamento de esgotos industriais. Para colher as lamas, utilizar garrafas de boca larga de polietileno ou de um material semelhante. Adicionar as lamas às garrafas até ao topo, deixando 1 cm, vedá-las bem, preferencialmente com uma válvula de segurança [ponto 12, alínea e)] e colocá-las em contentores isolantes [ponto 12, alínea d)], para minimizar as diferenças de temperatura até serem transferidas para a incubadora e mantidas a 35 °C ± 2 °C. Ao abrir as garrafas, libertar o excesso de gás afrouxando a rolha ou abrindo a válvula [ponto 12, alínea e)]. É preferível utilizar as lamas após a sua colheita, mas se tal não for possível, guardá-las a 35 °C ± 2 °C durante três dias e borbulhar azoto gasoso no volume livre de líquido das garrafas, para diminuir a atividade da mistura.

Aviso — A digestão das lamas liberta gases inflamáveis, o que representa risco de fogo e de explosão; as lamas contêm, também, organismos patogénicos. Devem, assim, tomar-se as devidas precauções ao trabalhar com as lamas. Por razões de segurança, não se devem utilizar recipientes de vidro na colheita das lamas.

Inóculo

16. Imediatamente antes de utilizar as lamas, misturá-las agitando suavemente e crivá-las através do crivo de malha de 1 mm^2 [ponto 12, alínea f)] para a garrafa apropriada [ponto 12, alínea g)], através da entrada pela qual vai passar a amostra de azoto. Retirar uma amostra para determinar a concentração de sólidos em peso seco (ver, por exemplo, a norma ISO 11 923 (13) ou um norma equivalente da UE). Preferencialmente, utilizar as lamas sem serem diluídas. A concentração de sólidos situa-se, em geralmente, entre os 2 % e 4 % (v/v). Verificar o pH das lamas e, se necessário, ajustá-lo para 7 ± 0,5.

Substrato

17. Dissolver em água desionizada 10 g de meio nutritivo (por exemplo, Oxoid), 10 g de extrato de levedura e 10 g de D-glucose e misturar até obter um volume final de 100 ml. Esterilizar por filtração com um filtro de membrana 0,2 μm [ponto 12, alínea h)] e utilizar imediatamente, ou guardar a 4 °C não mais do que um dia.

Produto químico em estudo

18. Preparar soluções-mãe de cada um dos produtos químicos em estudo, que contenham, por exemplo, 10 g/l do produto químico em água isenta de oxigénio (ponto 14). Utilizar os volumes apropriados nas soluções-mãe, de forma a preparar as misturas de reação com as concentrações desejadas. Preparar a série de diluições para cada solução-mãe, de modo a que o volume adicionado a cada garrafa seja o mesmo para cada concentração. O pH das soluções-mãe deve ser ajustado para 7 ± 0,2, se necessário.

19. No caso de produtos químicos pouco solúveis em água, consultar a norma ISO 10 634 (12) ou uma norma equivalente da UE. Se for necessário utilizar um solvente orgânico, devem evitar-se solventes como clorofórmio e o tetracloreto de carbono, que inibem fortemente a produção de metano. Preparar a solução de uma determinada concentração do produto químico insolúvel com um solvente volátil — por exemplo, acetona ou éter etílico. Adicionar os volumes necessários da solução do solvente a garrafas vazias [ponto 12, alínea b)] e evaporar o solvente antes de adicionar as lamas. Para outros tratamentos, consulte a norma ISO 10 634 (12) ou uma norma equivalente da UE, tendo porém em conta que qualquer agente tensioativo utilizado para produzir emulsões pode ser inibidor da produção anaeróbia de gás. Caso se considere que a presença de solventes orgânicos e de agentes emulsionantes produz efeitos indesejados, o produto químico em estudo pode ser adicionado diretamente à mistura na forma de pó ou líquido. Os produtos químicos voláteis e líquidos insolúveis em água podem ser injetados e inoculados através da membrana das garrafas, utilizando as microsseringas [ponto 12, alínea i)].

▼M6

20. Adicionar o produto químico em estudo às garrafas de forma a obter uma série geométrica de concentrações, por exemplo, 500 mg/l, 250 mg/l, 125 mg/l, 62,5 mg/l, 31,2 mg/l e 15,6 mg/l. Se não forem conhecidos limites de toxicidade de produtos químicos afins, realizar um teste preliminar de despistagem desses limites, com concentrações de 1 000 mg/l, 100 mg/l e 10 mg/l.

Produto químico de referência

21. Preparar uma solução aquosa de 3,5-diclorofenol (10 g/l), adicionando gradualmente e agitando pequenas quantidades de uma solução de hidróxido de sódio 5 mol/l, até se dissolver. Depois, adicionar a água isenta de oxigénio (ponto 14) até ao volume requerido; o recurso a ultrassons pode ajudar a dissolução. Podem utilizar-se outros produtos químicos de referência se os limites médios da EC_{50} já tiverem sido estabelecidos em três testes com inóculos diferentes (origens ou momentos de recolha diferentes).

INTERFERÊNCIAS/ERROS

22. Alguns componentes das lamas podem reagir com inibidores, tornando-os indisponíveis para os microrganismos e produzindo assim uma inibição baixa ou nula. Por outro lado, se as lamas contiverem já um produto químico inibidor, os resultados podem ser erróneos quando esse produto químico é testado. Existe um certo número de outros fatores que podem originar resultados erróneos. Estes fatores estão listados no apêndice 3, juntamente com os métodos destinados a eliminar ou reduzir os seus efeitos.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

23. O número de replicados necessários depende do grau de precisão requerido para os índices de inibição. Se as rolhas das garrafas fornecerem garantias para toda a duração do ensaio, preparar só um conjunto de garrafas (pelo menos, 3 triplicados) para cada concentração requerida. Do mesmo modo, preparar um conjunto de garrafas com o produto químico de referência e um conjunto com os controlos. No entanto, se a vedação das garrafas só for fiável para uma ou poucas perfurações, preparar um conjunto de garrafas (por exemplo, um triplicado) para cada intervalo (t) no qual são requeridos resultados para todas as concentrações do produto químico em estudo. Preparar, igualmente, um conjunto de garrafas «t» para o produto químico de referência e os controlos.

24. É aconselhável a utilização de uma câmara de fluxo laminar com luvas [ponto 12, alínea j)]. Pelo menos, 30 minutos antes de iniciar o teste, colocar na câmara todo o material e equipamento necessário e injetar azoto gasoso. Confirmar que a temperatura das lamas se mantém nos 35 °C ± 2 °C durante o manuseamento e a selagem das garrafas.

Ensaio preliminar

25. Se a atividade das lamas for desconhecida, recomenda-se a realização de um ensaio preliminar. Preparar um conjunto de controlos que tenham, por exemplo, concentrações de sólidos de 10 g/l, 20 g/l e 40 g/l mais o substrato, mas não tenham o produto químico. Utilizar, também, volumes diferentes da mistura de reação, de modo a ter 3 a 4 partes de espaço de volume vazio em relação ao volume de líquido. A partir dos resultados de volume de gás produzido em intervalos de tempo diferentes, as condições selecionadas permitem duas medições diárias para determinar o rendimento e a libertação de pressão por dia[1], sem provocar risco de explosões.

Adição do produto químico em estudo

26. Introduzir nas garrafas os produtos químicos em estudo solúveis [ponto 12, alínea b)], na forma de soluções aquosas (ponto 18). Utilizar um conjunto de três replicados para cada intervalo de concentrações (ponto 20). No caso de

▼M6

produtos químicos insolúveis ou pouco solúveis em água, injetar nas garrafas vazias, com uma microsseringa, soluções destes em solventes orgânicos, preparando um conjunto de replicados de cinco concentrações para cada produto químico em estudo. Evaporar o solvente borbulhando azoto gasoso à superfície da solução nas garrafas. Alternativamente, introduzir diretamente nas garrafas os produtos químicos insolúveis, na forma de sólidos.

27. Se um produto químico insolúvel ou pouco solúvel em água for adicionado sem a utilização de um solvente, introduzi-lo diretamente com uma microsseringa nas garrafas após a adição do inóculo e do substrato (ver ponto 30). Os produtos químicos voláteis podem ser manipulados da mesma forma.

Adição do inóculo e do substrato

28. Colocar numa garrafa de 5 litros [ponto 12, alínea g)], sob agitação, um volume conhecido de lamas crivadas (ver ponto 16), fazendo passar uma corrente de azoto gasoso pelo volume vazio da garrafa. Passar também uma corrente de azoto gasoso, durante 2 min, pelas garrafas que contêm as soluções aquosas ou as soluções do produto químico com o solvente já evaporado, para remoção do ar. Distribuir pelas garrafas alíquotas de 100 ml das lamas, bem misturadas, utilizando uma pipeta de boca larga ou uma proveta. É essencial que se encha a pipeta de uma só vez, para evitar que a amostra assente. Se não for esse o caso, voltar a agitar a amostra e a encher a pipeta.

29. Em seguida, adicionar uma solução de substrato suficiente para obter uma concentração final de 2 g/l do meio nutritivo, do extrato de levedura e da D-glucose na mistura, enquanto o azoto é ainda adicionado. O quadro seguinte apresenta alguns exemplos de testes que pode levar a cabo.

Concentração final do produto químico nas garrafas (mg/l)	Volume do produto químico (ml)		Reagentes e meios de cultura (ml)		
	Solução-mãe a) 10 g/l ponto 18	Solução-mãe b) 1 g/l ponto 18	Diluição ponto 14	Inóculo ponto 16	Substrato ponto 17
0	—	0	1,0	100	2
1	—	0,1	0,9	100	2
3,3	—	0,33	0,67	100	2
10	0,1	—	0,9	100	2
33	0,33	—	0,67	100	2
100	1,0	—	0	100	2

Volume total da garrafa = 160 ml. Volume de líquido = 103 ml
Volume do gás = 57 ml, ou 35,6 % do volume total.

30. Da mesma forma, lavar com azoto gasoso garrafas de teste vazias para trabalhar com qualquer produto químico insolúvel ou pouco solúvel em água (ponto 27).

▼M6

Controlos e produto químico de referência

31. Preparar, pelo menos, três conjuntos de garrafas que contenham só as lamas e o substrato, que constituirão os controlos. Preparar, ainda, replicados de garrafas que contenham as lamas, o substrato e a solução-mãe do produto químico de referência, 3,5-diclorofenol (parágrafo 21), para uma concentração final de 150 mg/l. Esta concentração deve inibir a produção de gás em 50 %. Alternativamente, estabelecer um intervalo de concentrações para o produto químico de referência. Devem preparar-se, ainda, mais quatro garrafas para as medições do pH que contenham as lamas, a água livre de oxigénio e o substrato. Introduzir em duas dessas garrafas a concentração mais elevada de produto químico utilizada e adicionar água isenta de oxigénio às duas garrafas restantes.

32. Assegurar que todas as garrafas contêm o mesmo volume de líquido (V_R) dos produtos químicos em estudo, dos produtos químicos de referência e dos controlos; se necessário, adicionar água desionizada, isenta de oxigénio (parágrafo 14), para perfazer o volume. O volume vazio do recipiente deve situar-se entre os 10 % e os 40 % em relação à sua capacidade total; este valor deve ser escolhido com base nos resultados obtidos com o ensaio preliminar. Após introduzir todos os componentes nas garrafas, remover a agulha de aporte do gás e vedar cada garrafa com uma rolha de borracha e uma tampa de alumínio [ponto 12, alínea b)], humedecendo a rolha com água desionizada para ajudar à sua colocação. Misturar o conteúdo de cada garrafa agitando suavemente.

Incubação das garrafas

33. Transferir as garrafas para a incubadora, preferencialmente com agitação, e colocá-las a 35 °C ± 2 °C. As garrafas são incubadas na obscuridade. Depois de 1 h, equilibrar a pressão das garrafas com a pressão atmosférica, inserindo uma agulha de seringa, ligada a um medidor de pressão [ponto 12, alínea c)], através da rolha de cada garrafa. Abrir a válvula até que a pressão chegue a zero e voltar a fechar a válvula. A agulha deve estar inserida com um ângulo de cerca de 45.º, para impedir a perda de gás. Se as garrafas forem incubadas sem agitação, agitar manualmente duas vezes por dia durante todo o período de incubação, para equilibrar o sistema. Ao incubar as garrafas, colocá-las invertidas para impedir a libertação de gás através da rolha. Nos casos em que os produtos químicos em estudo são insolúveis, a inversão das garrafas não é aconselhável devido à possível aderência dos mesmos à base das garrafas.

Medições de pressão

34. Quando as garrafas estão a 35 °C ± 2 °C, medir e registar o pH de duas das quatro garrafas, descartando o seu conteúdo; deixar as restantes na incubadora, na obscuridade. Medir e registar a pressão das garrafas, duas vezes por dia, nas 48 h a 72 h seguintes, inserindo a agulha ligada ao medidor de pressão através da rolha. Ligar a agulha entre cada medição. Manter as garrafas à temperatura de incubação durante as medições, que devem ser realizadas tão rapidamente quanto possível. Deixar a pressão estabilizar e registá-la. Abrir a válvula para equilibrar, fechando-a quando atingir o zero. Prosseguir o ensaio durante as 48 h subsequentes à primeira leitura, a qual é designada como «tempo 0». O número de leituras e de aberturas para produtos químicos voláteis deve ser só um (no final do período de incubação) ou dois, para minimizar a perda do produto químico em estudo (10).

35. Se a leitura de pressão for negativa, não abrir a válvula. A mistura pode, por vezes, acumular-se na agulha e na tubagem, dado origem a uma leitura de pressão negativa. Se for este o caso, remover a agulha, agitar a tubagem, secar com um pano e introduzir uma agulha nova.

Medições de pH

36. Medir e registar o pH dos conteúdos de cada garrafa após a medição da pressão final.

▼M6

DADOS E RELATÓRIOS

Expressão dos resultados

37. Calcular a soma e a média das pressões registadas em cada intervalo de tempo em cada conjunto de replicados, bem como a sua média cumulativa para cada pressão de gás. Traçar os gráficos da produção de gás (Pa) (média cumulativa) em função do tempo, para o controlo, as garrafas de referência e de ensaio. Selecionar um tempo na zona linear da curva, geralmente nas 48 h, e calcular a inibição percentual (I) para cada concentração, a partir da seguinte equação [1]:

$$I = (1 - P_t/P_C) \times 100 \quad [1],$$

em que

I inibição, expressa em percentagem;

P_t pressão do gás produzido com o material em estudo para um determinado tempo, em Pascal (Pa);

P_c pressão do gás produzido no controlo para um determinado tempo em Pascal (Pa).

É aconselhável traçar duas curvas, isto é, a curva I, em função da concentração, e a curva II, em função do logaritmo da concentração; deve selecionar-se a zona da curva mais próxima da linearidade. Determinar a EC_{50} (mg/l) visualmente ou por cálculo da regressão linear. Em estudos comparativos, pode ser mais útil expressar a concentração do produto químico em mg/g de sólidos totais (peso seco). Para obter esta concentração, dividir a concentração volumétrica (mg/l) pela concentração volumétrica das lamas sólidas secas (g/l) (ponto16).

38. Calcular a inibição percentual para cada concentração do produto químico de referência utilizado, ou a EC_{50}, se tiver sido estudado um número significativo de concentrações.

39. Converter em volume a pressão média do gás produzido no controlo P_c (Pa), com base na curva de calibração do medidor de pressão (apêndice 2); a partir desse valor, calcular o rendimento de gás, expresso em volume produzido em 48 h a partir de 100 ml de lamas não diluídas, numa concentração de 2 g/l (20 g/l) a 4 % (40 g/l).

Critérios de validação

40. Os resultados obtidos o estudo interlaboratorial da ISO (5) mostraram que o produto químico de referência (3,5-diclorofenol) causa 50 % de inibição na produção de gás num intervalo de concentrações entre 32 mg/l e 510 mg/l, com a média nos 153 mg/l (parágrafo 10). Este intervalo de concentrações é tão vasto que é impossível de estabelecer com razoabilidade os limites de inibição; tal só será possível quando os inóculos se tornarem mais reprodutíveis. Os volumes de gás produzido nos controlos em 48 h variam entre 21 ml/g de peso seco de lamas e 149 ml/g (média 72 ml/g). Não há uma relação consistente entre o volume de gás produzido e o valor de EC_{50} correspondente. O pH final varia entre 6,1 e 7,5.

41. O ensaio é considerado válido quando se obtém uma inibição superior a 20 % no controlo de referência (150 mg/l de 3,5-diclorofenol), o branco produz mais de 50 ml de gás por g de peso seco e o pH, no final, se situa entre 6,2 e 7,5.

Relatório do ensaio

42. O relatório deve obrigatoriamente incluir as seguintes informações:

Produto químico em estudo

— nome vulgar, denominação química, número CAS, fórmula estrutural e principais propriedades fisico-químicas;

▼M6

— pureza (teor de impurezas).

Condições experimentais

— volume do líquido e do espaço vazio dos recipientes utilizados;

— descrição dos recipientes utilizados e da forma de medição do gás (por exemplo, tipo de medidor de gás);

— forma de aplicação do produto químico em estudo e do produto químico de referência, concentrações utilizadas e quais os solventes;

— descrição detalhada do inóculo utilizado; nome da estação de tratamento de esgoto, descrição da origem das águas residuais tratadas (por exemplo, temperatura, tempo de retenção das lamas, predominantemente, de origem doméstica ou industrial, etc.), concentração de sólidos, atividade de produção de gás no digestor anaeróbio, possível exposição ou pré-tratamento com produtos químicos tóxicos ou local de colheita do lodo, sedimento, etc.;

— temperatura de incubação e sua variação etc.;

— temperatura de incubação, com o respetivo intervalo de variação;

— número de replicados.

Resultados

— valores de pH no final do ensaio;

— todas as medições realizadas nos recipientes de teste, de controlo, do branco e do produto químico de referência, em forma de quadro (por exemplo, pressão em Pa ou milibares;

— inibição, em percentagem, determinada nas garrafas de ensaio e de referência; curvas concentração *versus* inibição;

— cálculo dos valores de EC_{50}, expressos em mg/l e mg/g;

— produção de gás por grama de lamas, em 48 horas;

— motivos para a rejeição de algum dos resultados obtidos;

— discussão dos resultados, incluindo alguma alteração efetuada ao método descrito, nomeadamente com base em interferências e erros ocorridos que se desviem do esperado;

— referir se a finalidade do teste consistiu, também, em medir a toxicidade para microrganismos nunca expostos ou pré-expostos ao produto químico em estudo.

REFERÊNCIAS

(1) Capítulo C.11 do presente anexo (Lamas ativadas — ensaio de inibição da respiração).

(2) Capítulo C.43 do presente anexo (Ensaio de biodegradabilidade anaeróbia de substâncias orgânicas em lamas digeridas: método por medição da produção gasosa).

(3) Organização Internacional de Normalização (2003) ISO 13 641-1 Water Quality — Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria — Part 1: General Test.

(4) Organização Internacional de Normalização (2003) ISO 13 641-2 Water Quality — Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria — Part 2: Test for low biomass concentrations.

(5) ISO (2000) Ring test of ISO 13 641-1 & ISO 13 641-2. Determination of inhibition of activity of anaerobic bacteria. BL 6958/A. Evans MR, Painter HA. Brixham Environmental Laboratory, AstraZeneca UK Ltd., Brixham, TQ5 8BA UK.

▼M6

(6) Swanwick JD, Foulkes M (1971). Inhibition of anaerobic digestion of sewage sludge by chlorinated hydrocarbons. Wat. Pollut. Control, 70, 58-70.

(7) HMSO (1986) Determination of the inhibitory effects of chemicals and waste waters on the anaerobic digestion of sewage sludge. ISBN 0 117519 43 X, In: Methods for the Examination of Waters and Associated Materials UK.

(8) Shelton DR, Tiedje JM (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential. Appl. Env. Microbiol. 47 850-857.

(9) Battersby NS & Wilson V (1988). Evaluation of a serum bottle technique for assessing the anaerobic biodegradability of organic compounds under methanogenic conditions. Chemosphere 17, 2441-2460.

(10) Wilson V, Painter HA & Battersby NS (1992). A screening method for assessing the inhibition of the anaerobic gas production from sewage sludge. Proc. Int. Symp. on Ecotoxicology. Ecotoxicological Relevance of Test Methods, GSF Forschungzentrum, Neuherberg, Germany (1990). Eds. Steinberg C & Kettrup A, pp117-132 (1992).

(11) Kawahara K, Yakabe Y, Chida T, & Kida K (1999). Evaluation of laboratory-made sludge for an anaerobic biodegradability test and its use for assessment of 13 chemicals. Chemosphere, 39 (12), 2007-2018.

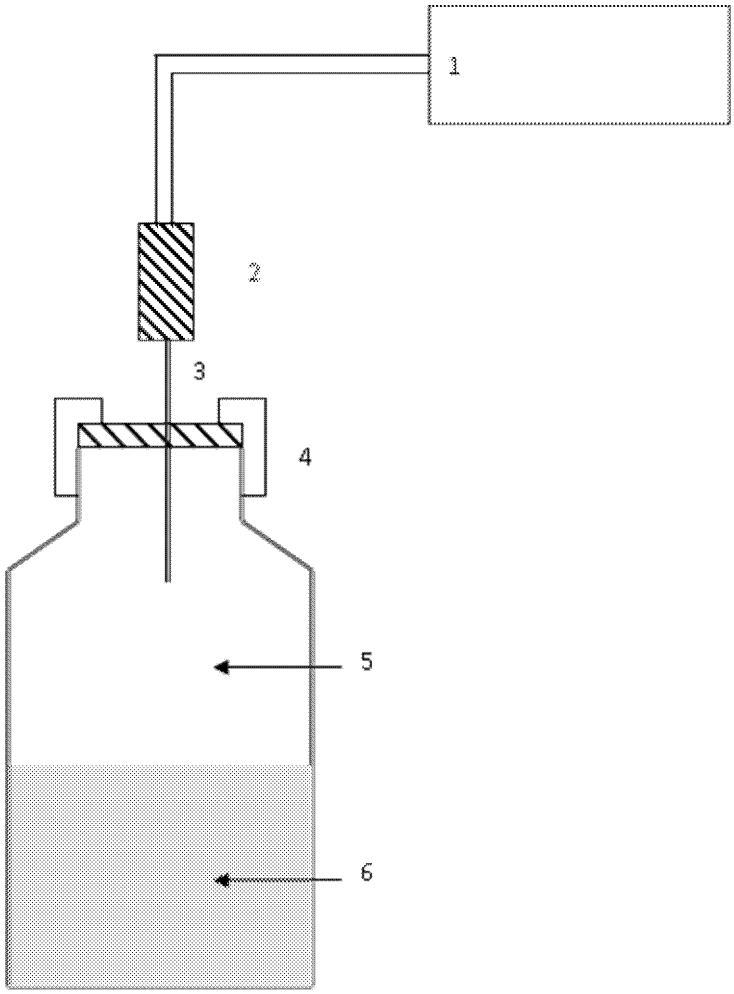
(12) Organização Internacional de Normalização (1995) ISO 10 634 Water Quality — Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

(13) Organização Internacional de Normalização (1997) ISO 11 923 Water Quality — Determination of suspended solids by filtration through glass-fibre filters.

▼**M6**

Apêndice 1

Exemplo de uma montagem para medir a produção de biogás utilizando a pressão do gás



Legenda:

1 — Medidor de pressão

2 — Válvula de gás de três vias

3 — Agulha da seringa

4 — Vedante à prova de gás (tampa metálica e rolha)

5 — Volume livre

6 — Inóculo

As garrafas são colocadas num ambiente a 35 °C ± 2 °C

▼**M6**

Apêndice 2

Conversão do medidor de pressão

As leituras no medidor de pressão podem estar relacionadas com o volume do gás por intermédio de uma curva-padrão; pode, assim, calcular-se o volume do gás produzido por g de lama seca durante 48 h. Este índice de atividade é utilizado com um dos critérios de validação dos resultados obtidos. A curva de calibração é definida injetando volume conhecidos de gás a 35 °C ± 2 °C em frascos de soro que contêm um volume de água igual ao da mistura de reação, V_R;

— Colocar V_R ml de alíquotas de água, mantidas a 35 °C ± 2 °C, em cinco frascos de soro. Vedar as garrafas e colocá-las num banho de água a 35 °C ± 2 °C durante 1h, para uniformizar;

— Ligar o medidor de pressão, deixá-lo estabilizar e ajustar o zero;

— Inserir a agulha da seringa através da tampa de uma das garrafas, abrir a válvula até que o medidor de pressão chegue a zero e depois fechar a válvula;

— Repetir o procedimento com as restantes garrafas;

— Injetar 1 ml de ar a 35 °C ± 2 °C em cada uma das garrafas. Inserir a agulha (no medidor) através da tampa de uma das garrafas e deixar a pressão estabilizar. Registar a pressão, abrir a válvula até que a pressão chegue a zero e depois fechar a válvula;

— Repetir o procedimento com as restantes garrafas;

— Repetir todo o procedimento utilizando 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml, 12 ml, 16 ml, 20 ml, e 50 ml de ar;

— Traçar uma curva de conversão da pressão (Pa) em função do volume do gás injetado (ml). A resposta do aparelho é linear para o intervalo de pressão entre 0 Pa e 70 000 Pa e entre 0 ml e 50 ml de gás produzido.

▼M6

Apêndice 3

Fatores identificados que podem originar resultados falseados

a) *Qualidade das tampas das garrafas*

Estão disponíveis no comércio diferentes tipos de vedantes dos frascos de soro, muitos dos quais — inclusive a borracha de butilo — perdem a firmeza quando são espetados com a agulha nas condições experimentais do presente ensaio. Por vezes, a pressão baixa muito lentamente quando a tampa é espetada com a agulha da seringa. A utilização de tampas estanque para os gases é recomendada para obviar estas falhas [ponto 12, alínea b)].

b) *Humidade na agulha da seringa*

Por vezes, a humidade acumula-se na agulha da seringa e na tubagem, o que pode ser detetado ao ler-se uma ligeira pressão negativa. Para suprir este problema, remover a agulha e agitar a tubagem; secar com um pano e colocar uma nova agulha (pontos 12, alínea c), e 35).

c) *Contaminação com oxigénio*

Os métodos anaeróbios estão sujeitos a erros por contaminação com oxigénio, o qual pode causar uma menor produção de gás. No presente método, essa possibilidade deve ser minimizada pela utilização de técnicas estritamente anaeróbias, inclusive a utilização de um porta-luvas.

d) *Substrato mais grosseiro nas lamas*

A produção anaeróbia de gás e a sensibilidade das lamas são influenciadas pelos substratos transferidos com o inóculo para as garrafas. As lamas digeridas em digestores anaeróbios domésticos contêm, frequentemente, pelos e resíduos vegetais de celulose, o que torna difícil retirar amostras representativas. Ao crivar as lamas, promove-se a remoção das matérias insolúveis mais grosseiras, o que permite colher amostras representativas (ponto 16).

e) *Produtos químicos voláteis*

Os produtos químicos voláteis acumulam-se no espaço vazio das garrafas de ensaio. Podem, por isso, registar-se perdas de produto após as medições de pressão, originando valores de EC_{50} erroneamente elevados. O problema pode ser suprido ajustando a relação entre o volume de espaço vazio e o volume de líquido e não efetuar purgas após as medições de pressão (10).

f) *Produção não linear de gás*

Se a curva da média cumulativa de produção de gás em função do tempo de incubação não for aproximadamente linear no período de 48 h, a precisão do teste pode baixar. Para ultrapassar este problema, é aconselhável utilizar lamas de uma origem diferente e/ou aumentar a concentração do meio nutritivo, do extrato de levedura e da glucose (ponto 29).

▼M6

Apêndice 4

Aplicação a amostras naturais com biomassas baixas — lodos anaeróbios, sedimentos, etc.

Introdução

A.1 Geralmente, a atividade microbiana específica que ocorre naturalmente em lodos anaeróbicos, sedimentos, solos, etc.. é bastante mais baixa do que a que ocorre em lamas anaeróbicas derivadas de esgotos. Por isso, quando são medidos os efeitos inibitórios de produtos químicos nestas amostras de lamas menos reativas, algumas das condições experimentais podem ser modificadas. Para estas lamas menos reativas, pode proceder-se de duas formas:

a) Alterar o teste preliminar (ponto 25) com uma amostra de lama, solo, etc., a 35 °C ± 2 °C ou mantendo a temperatura do local onde foi recolhida para uma simulação mais precisa (como indicado na parte 1 da norma ISO 13 641);

b) Realizar o teste com a lama diluída (1 para 100), para estimular a esperada baixa atividade da amostra natural, mas mantendo a temperatura a 35 °C ± 2 °C (como indicado na parte 2 da norma ISO 13 641).

A.2 A opção (a) pode ser executada pelo método aqui descrito (equivalente à parte 1 da ISO 13 641); porém, é essencial realizar um teste preliminar (parágrafo 25) para estabelecer as condições ótimas, a não ser se estas já tenham sido descritas em testes anteriores. A amostra de lodo ou de sedimento deve ser minuciosamente misturada utilizando, por exemplo, um liquidificador e, se necessário, diluindo com água arejada (ponto 14), de modo que possa ser utilizada uma pipeta de ponta grossa ou uma proveta. Caso se considere que faltam nutrientes, a amostra de lodo pode ser centrifugada (em condições anaeróbicas) e ressuspendida num meio de cultura mineral contendo extrato de levedura (A.11).

A.3 Opção (b). Este procedimento imita razoavelmente a baixa atividade das amostras naturais, mas carece da alta concentração de sólidos suspensos presentes nessas amostras. O papel dos sólidos suspensos na inibição não é conhecido, mas é possível que a reação entre o produto químico em estudo e os constituintes do lodo, assim como a adsorção do produto químico em estudo nestes sólidos, possa resultar numa diminuição da toxicidade do produto químico em estudo.

A.4 A temperatura é outro fator importante: em simulações rigorosas, os ensaios devem ser realizados à temperatura do local de colheita, pois é sabido que os diferentes tipos de bactérias produtoras de metano preferem gamas de temperaturas muito diversas — podendo classificar-se, nomeadamente, em termófilas (~ 30-35 °C), mesófilas (20-25 °C) e psicrófilas (< 20 °C) –, o que origina padrões de inibição muito variados.

A.5 Duração. Na parte 1 do ensaio normalizado, que utiliza lamas não diluídas, a produção de gás nos primeiros 2-4 dias é sempre suficiente, enquanto na parte 2, com uma amostra diluída 100 vezes, a quantidade de gás produzido no teste interlaboratorial é insuficiente ou nula. Na sua descrição do ensaio, Madsen *et al*. (1996) recomendam que a duração do ensaio seja de, pelo menos, 7 dias.

Concentrações baixas de biomassa (opção b)

É necessário efetuar as seguintes modificações e alterações, aditando ou substituindo alguns pontos do texto principal.

▼**M6**

A.6 Aditar ao ponto 6: Princípio do ensaio

«Esta técnica pode ser utilizada com 1 em 100 lamas anaeróbias diluídas, para estimular parcialmente a baixa atividade dos lodos e dos sedimentos. A temperatura de incubação pode ser 35 °C ou a do local onde a amostra foi recolhida. Como a atividade bacteriana é muito inferior quando comparada com a amostra não diluída, o período de incubação deve ser aumentado para, pelo menos, 7 dias.»

A.7 Aditar ao ponto 12, alínea a):

«A incubadora deve poder funcionar a 15 °C.»

A.8 No final do ponto 13, aditar um reagente suplementar:

«Ácido fosfórico (H_3PO_4), solução em água a 85 %, em massa.»

A.9 No final do ponto 16, aditar o seguinte:

«Utilizar uma concentração final de 0,20 ± 0,05 g/l de peso seco de sólidos totais.»

A.10 Ponto 17. Substrato em estudo

Este substrato não pode ser utilizado e deve ser substituído por extrato de levedura (ver pontos 17; A.11, A.12, A.13).

A.11 É necessário um meio de cultura mineral, incluindo os elementos vestigiais, sendo conveniente adicionar um substrato orgânico, como o extrato de levedura.

No final do ponto 17, aditar o seguinte:

«a) Meio mineral em estudo, com extrato de levedura.

É preparado a partir de meio de cultura concentrado [ponto 17, alínea b); A. 12] com uma solução de elementos vestigiais (ponto 17, alínea c); A.13). Utilizar sulfureto de sódio não hidratado recente [ponto 17, alínea b); A.12], ou lavá-lo e secá-lo antes da utilização, para garantir que mantém a sua capacidade de redução. Se o ensaio for realizado sem a câmara de fluxo laminar com luvas [ponto 12, alínea j)], a concentração de sulfureto de sódio na solução-mãe deve ser aumentada para 2 g/l (de 1g/l). O sulfureto de sódio deve, também, ser adicionado através da rolha das garrafas, com vista a reduzir o risco de oxidação, para uma concentração final de 0,2 g/l. Alternativamente, pode utilizar-se citrato de titânio (III) [parágrafo 17 (b)]. Neste caso, adicioná-lo através da rolha da garrafa, para uma concentração entre os 0,8 mmol/l e 1,0 mmol/l. O citrato de titânio (III) é muito eficaz; é um agente de reduzida toxicidade que se prepara da seguinte forma: dissolver 2,94 g de citrato trissódico di-hidratado em 50 ml de água sem oxigénio (ponto 14) — o que resulta numa solução de 200 mmol/l — e adicionar 5 ml de solução de cloreto de titânio (III) (15 g/100 ml em água). Neutralizar até pH 7 ± 0,5 com carbonato de sódio e colocar num frasco de soro sob fluxo de azoto gasoso. A concentração final de citrato de titânio (III) na solução-mãe é de 164 mmol/l. Utilizá-la imediatamente ou guardá-la a 4 °C, não mais do que um dia.

A.12 (b) Meio de ensaio concentrado dez vezes, preparado com os seguintes compostos:

Di-hidrogenofosfato de potássio anidro (KH_2PO_4)	2,7 g
Hidrogenofosfato dissódico (Na_2HPO_4)	4,4 g
(ou 11,2 g de deca-hidratado)	5,3 g
Cloreto de amónio (NH_4Cl)	

▼**M6**

Cloreto de cálcio di-hidratado ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0,75 g
Cloreto de magnésio hexa-hidratado ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	1,0 g
Cloreto de ferro (II) tetra-hidratado ($FeSO_4 \cdot 4H_2O$)	0,2 g
Resazurina (indicador redox)	0,01 g
Sulfato de sódio nona-hidratado ($Na_2S \cdot 9H_2O$)	1,0 g
[ou citrato de titânio (III)] conc.final	0,8 mmol/l a 1,0 mmol/l
Solução de elementos vestigiais [ver ponto 17, c); A.13]	10,0 ml
Extrato de levedura	100 g
Dissolver em água de diluição (ponto 14) e perfazer até	1 000 ml

A.13 (c) Solução de elementos vestigiais, preparada com os seguintes compostos:

Cloreto de manganês (II) tetra-hidratado ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	0,5 g
Ácido ortobórico (H_3BO_3)	0,05 g
Cloreto de zinco ($ZnCl_2$)	0,05 g
Cloreto de cobre (II) ($CuCl_2$)	0,03 g
Molibdato de sódio di-hidratado ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	0,01 g
Cloreto de cobalto (II) hexa-hidratado ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	1,0 g
Cloreto de níquel (II) hexa-hidratado ($NiCl_2 \cdot 6H_2O$)	0,1 g
Selenito dissódico (Na_2SeO_3)	0,05 g
Dissolver em água de diluição (ponto 14) e perfazer até	1 000 ml».

A.14 Ponto 25: Ensaio preliminar

É essencial que o ensaio preliminar seja realizado de acordo com o ponto 24, exceto se a concentração sólida das lamas for 100 vezes superior à apresentada. Então, o teste deve ser realizado com 0,1g/l, 0,2g/l e 0,4g/l. A duração da incubação deve ser de, pelo menos, 7 dias.

Nota: se, no teste de intercalibração (5), o volume livre de líquido foi da ordem de 75 % do volume total, é recomendável que se mantenha na ordem dos 10 %-40 %. O que importa reter é que o volume de gás produzido para 80 5 de inibição deve ser medido com uma precisão aceitável (por exemplo, ±5 % a ±10 %).

A.15 Pontos 26 a 30: Adição do produto químico em estudo, do inóculo e do substrato

As adições são realizadas com descrito nos pontos respetivos, mas a solução de substrato (ponto 17) é substituída pelo meio de cultura com o extrato de levedura (A.11).

Para além disso, a concentração final das lamas em peso seco é reduzida de 2 g/l — 4 g/l para 0,2 ± 0,05 g/l (A.9). Dois exemplos da adição de constituintes à mistura de reação são apresentados no quadro A.1, que substitui o quadro constante do ponto 29.

A.16 Ponto 33: Incubação das garrafas

Dado a taxa de produção de gás ser mais baixa, o tempo de incubação é aumentado para 7 dias.

▼**M6**

A.17 Ponto 34: Medições de pressão

Se forem necessárias as quantidades de gás na fase gasosa, utiliza-se o procedimento descrito no ponto 34 para medir a pressão. Se forem medidas as quantidades de CO_2 e CH_4, o pH da fase líquida é reduzido para 2 por injeção de H_3PO_4 em cada uma das garrafas que se achar adequado, sendo a pressão medida após 30 minutos. No entanto, é mais útil medir a pressão em cada uma das garrafas, antes e após a acidificação. Por exemplo, se a taxa de produção de CO_2 for muito mais alta que a do metano, a sensibilidade das bactérias fermentativas pode ser alterada e/ou as bactérias metanogénicas são mais afetadas pelo produto químico em estudo.

A.18 Ponto 36: Medições de pH

Se se utilizar H_3PO_4, são necessários controlos aos quais não é adicionado H_3PO_4, especialmente para as medições de pH.

REFERÊNCIA:

Madsen, T, Rasmussen, HB; & Nilsson, L (1996), Methods for screening anaerobic biodegradability and toxicity of organic chemicals. Project No.336, Water Quality Institute, Danish Environment Protection Agency, Copenhaga.

Quadro A.1.

Exemplos de condições experimentais em ensaios descontínuos

Componentes das misturas de reação	Exemplo 1	Exemplo 2	Ordem de adição
Concentração de inóculo (g/l)	0,42	2,1	—
Volume de inóculo (ml)	45	9	4
Concentração de inóculo nas garrafas de ensaio (g/l)	0,20	0,20	—
Volume de meio de cultura adicionado (ml)	9	9	2
Volume de água de diluição adicionada (ml)	36	72	3
Concentração do extrato de levedura nas garrafas de ensaio (g/l)	9,7	9,7	—
Volume da solução-mãe do produto químico (ml)	3	3	1
Volume total de líquido (ml)	93	93	—

▼**M6**

Apêndice 5

Definições

No âmbito do presente método de ensaio, aplicam-se as seguintes definições:

Produto químico: uma substância ou mistura.

Produto químico em estudo: qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado o presente método de ensaio.

▼M6

C.35. ENSAIO DE TOXICIDADE PARA *LUMBRICULUS* NUM SISTEMA SEDIMENTO-ÁGUA COM SEDIMENTO ENRIQUECIDO

INTRODUÇÃO

1. Este método é equivalente ao *Test Guideline* TG 225 (2007) da OCDE. Os animais endobentónicos que ingerem sedimentos estão sujeitos a uma exposição potencialmente elevada aos produtos químicos presentes nesses sedimentos, devendo, por isso, ser objeto de especial atenção — ver, por exemplo, (1) (2) (3). De entre as espécies em causa, os oligoquetas aquáticos desempenham um papel importante nos sedimentos dos sistemas aquáticos. Dado causarem bioturvação dos sedimentos e constituírem presas, estes animais podem ter grande influência na biodisponibilidade dos produtos químicos em causa para outros organismos, como, por exemplo, os peixes bentívoros. Contrariamente aos organismos epibentónicos, os oligoquetas aquáticos endobentónicos (como *Lumbriculus variegatus*) enterram-se nos sedimentos e ingerem partículas destes abaixo da superfície. Garante-se assim a exposição dos organismos de ensaio ao produto químico em estudo por todas as vias de absorção possíveis (por exemplo, contacto e ingestão de partículas de sedimentos contaminados e também através da água ocluída e sobrenadante).

2. O presente método de ensaio foi concebido para avaliar os efeitos da exposição prolongada do oligoqueta endobentónico *Lumbriculus variegatus* (Müller) a produtos químicos associados aos sedimentos. Baseia-se nos atuais protocolos de ensaios de toxicidade e bioacumulação em sedimentos — por exemplo, (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10). O método é descrito para condições de ensaio estáticas. O cenário de exposição utilizado neste método de ensaio consiste no enriquecimento dos sedimentos com o produto químico em estudo. A utilização de um sedimento enriquecido tem por objetivo simular a sua contaminação com o produto químico em estudo.

3. Os produtos químicos a ensaiar com organismos que vivem nos sedimentos persistem, em geral, neste compartimento por longos períodos. A exposição dos referidos organismos pode ter lugar por várias vias. A importância relativa de cada via de exposição, bem como o tempo de contribuição de cada uma delas para os efeitos tóxicos globais, depende das propriedades físico-químicas do produto químico em causa e do seu destino final no espécime. No caso de substâncias fortemente adsorventes (por exemplo, com log K_{ow} > 5) ou de substâncias fixas aos sedimentos por ligações covalentes, a ingestão de alimentos contaminados pode constituir uma via de exposição significativa. Para não subestimar a toxicidade dos produtos químicos, o alimento necessário à reprodução e ao crescimento dos organismos de ensaio é adicionado aos sedimentos antes da aplicação do produto químico em estudo (11). O método descrito é suficientemente pormenorizado para que, na realização do ensaio, possam efetuar-se adaptações na conceção experimental, em função das condições, nomeadamente laboratoriais, e das características dos produtos químicos.

4. O método de ensaio tem por objetivo determinar os efeitos do produto químico em estudo na reprodução e na biomassa dos organismos sujeitos ao ensaio. Os parâmetros biológicos medidos são o número total de vermes sobreviventes e a biomassa (peso seco) no final da exposição. Estes dados são analisados por um método de regressão, com vista a estimar a concentração que causa um efeito de x % (por exemplo, EC_{50}, EC_{25} ou EC_{10}), ou por recurso a hipóteses estatísticas, com vista a determinar a concentração sem efeitos observáveis (NOEC) e a menor concentração com efeitos observáveis (LOEC).

5. O capítulo C.27 do presente anexo (Ensaio de toxicidade com quironomídeos num sistema água-sedimento com sedimentos enriquecidos) (6) apresenta muitas informações essenciais e úteis para a execução do método de ensaio de toxicidade dos sedimentos. Por conseguinte, o presente documento constitui a base a partir da qual se introduziram as modificações necessárias à realização de ensaios de toxicidade de sedimentos com *Lumbriculus variegatus*. Os outros documentos a que é feita referência são, por exemplo, o

▼M6

guia da ASTM para determinação da bioacumulação de contaminantes associados aos sedimentos com invertebrados bentónicos (3), os métodos da EPA (E.U.A) para determinar a toxicidade e a bioacumulação de contaminantes associados aos sedimentos com invertebrados de água doce (7) e o guia da ASTM para a recolha, a armazenagem, a caracterização e a manipulação de sedimentos para ensaios toxicológicos e para a seleção de amostras, a utilizar na recolha de invertebrados bentónicos (12). Por sua vez, a experiência obtida com a validação do método de ensaio (relatório de estudo interlaboratorial comparativo — 13) e os dados provenientes da literatura constituem importantes fontes de informação para a elaboração do presente documento.

REQUISITOS PRÉVIOS E DADOS DE ORIENTAÇÃO

6. Antes do início do ensaio, devem obter-se informações sobre o produto químico, como precauções em matéria de segurança, condições de armazenagem e métodos de análise adequados. As orientações para o ensaio de produtos cujas propriedades físico-químicas dificultam a realização dos ensaios constam da referência (14).

7. Antes de se proceder ao ensaio, deve dispor-se das seguintes informações sobre o produto químico em estudo:

   — nome comum, denominação química (preferivelmente a denominação IUPAC), fórmula estrutural, número de registo CAS, grau de pureza;

   — pressão de vapor;

   — solubilidade na água.

8. Considera-se também útil dispor das seguintes informações adicionais antes do início do ensaio:

   — coeficiente de partição octanol/água, K_{ow};

   — coeficiente de partição carbono orgânico/água, (K_{oc});

   — dados sobre hidrólise;

   — fototransformação na água;

   — biodegradabilidade;

   — tensão superficial.

9. Antes do início do ensaio, devem também obter-se informações sobre determinadas características dos sedimentos a utilizar (7). Para mais pormenores, ver pontos 22 a 25.

PRINCÍPIO DO ENSAIO

10. Expõem-se vermes num estado fisiológico idêntico (sincronizados como descrito no apêndice 5) a uma série de concentrações da substância tóxica, aplicada à fase sedimentar de um sistema sedimentos-água. Como meios, devem utilizar-se sedimentos artificiais e água reconstituída. Os controlos são feitos em recipientes de ensaio sem adição do produto químico em estudo. Os sedimentos são enriquecidos com o produto químico em várias concentrações, a fim de minimizar a variabilidade entre os replicados de cada concentração; os organismos de ensaio são subsequentemente introduzidos em recipientes nos quais as concentrações de sedimentos e de água tenham sido equilibradas (ver ponto 29). Os animais são expostos aos sistemas sedimento-água por um período de 28 dias. Atendendo ao baixo teor de nutrientes dos sedimentos artificiais, estes últimos devem ser modificados mediante a adição de uma fonte de alimento (ver pontos 22 a 23 e apêndice 4), para assegurar que os vermes se desenvolvem e se reproduzem em condições controladas. Garante-se, assim, a exposição dos animais através da água e dos sedimentos, bem como da alimentação.

11. O ponto final preferido deste tipo de estudo é a EC_x (por exemplo, EC_{50}, EC_{25} e EC_{10}, concentração com efeitos sobre x % dos organismos de ensaio) para a reprodução e a biomassa, respetivamente, em comparação com os controlos. Importa contudo referir que, perante a elevada incerteza

▼M6

associada aos valores baixos de EC_x (por exemplo, EC_{10} e EC_{25}) com limites de confiança a 95 % extremamente elevados (ver, por exemplo, a referência 15) e a representatividade estatística determinada nos testes de hipóteses, o parâmetro EC_{50} é considerado o ponto final mais adequado. Além disso, no que respeita à biomassa e à reprodução, é possível calcular a concentração sem efeitos observáveis (NOEC) e a menor concentração com efeitos observáveis (LOEC) se a conceção do ensaio e os dados apoiarem os cálculos (ver pontos 34 a 38). A conceção do ensaio depende do objetivo do estudo (determinação da EC_x ou da NOEC).

ENSAIOS DE REFERÊNCIA

12. O desempenho dos organismos de controlo deve demonstrar suficientemente a capacidade do laboratório para realizar o ensaio e, caso se disponha de dados históricos, a repetibilidade do ensaio. Podem também realizar-se ensaios de toxicidade de referência a intervalos regulares, utilizando uma substância tóxica de referência para avaliar a sensibilidade dos organismos de ensaio. Os ensaios de toxicidade de referência com água (96 h) apenas permitem demonstrar de forma satisfatória a sensibilidade e o estado dos animais — (4) (7). O apêndice 6 e o relatório do estudo interlaboratorial comparativo (13) apresentam informações sobre a toxicidade do pentaclorofenol (PCP) em ensaios completos (exposição a sedimentos enriquecidos durante 28 dias). A toxicidade aguda do PCP em ensaios realizados unicamente com água é descrita, por exemplo, em (16). Estas informações podem ser utilizadas para efeitos de comparação da sensibilidade do organismo de ensaio em ensaios de referência em que o PCP é o produto tóxico. O cloreto de potássio (KCl) e o sulfato de cobre ($CuSO_4$) foram recomendados como substâncias tóxicas de referência em ensaios com *L. variegatus* (4) (7). Até à data, afigura-se difícil estabelecer critérios de qualidade com base em dados de toxicidade do KCl, devido à escassez de dados bibliográficos relativos à espécie *L. variegatus*. As referências (17) a (21) contêm informações sobre a toxicidade do cobre para a *L. variegatus*.

VALIDADE DO ENSAIO

13. Um ensaio é considerado válido quando satisfaz os seguintes critérios:

— Um estudo interlaboratorial comparativo (13) demonstrou que, no caso da espécie *Lumbriculus variegatus*, o número médio de indivíduos vivos por replicado nos controlos deve ter aumentado, no final da exposição, num fator mínimo de 1,8 relativamente ao número de indivíduos por replicado no início da exposição.

— O pH da água sobrenadante está compreendido entre 6 e 9, durante todo o ensaio.

— A concentração de oxigénio na água sobrenadante não é inferior a 30 % do valor da saturação no ar (VSA), à temperatura de ensaio, durante o mesmo.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

Sistema de ensaio

14. São recomendados os sistemas estáticos, sem renovação da água sobrenadante. Se o rácio sedimento-água (ver ponto 15) for adequado, bastará, em geral, um arejamento ligeiro para manter a qualidade da água a níveis aceitáveis para os organismos de ensaio (por exemplo, maximização dos teores de oxigénio dissolvido, minimização da acumulação de produtos de excreção). Os sistemas semiestáticos ou de escoamento com renovação intermitente ou contínua da água sobrenadante devem ser utilizados apenas em casos excecionais, uma vez que a renovação regular da água sobrenadante pode afetar o equilíbrio químico, causando, por exemplo, perdas do produto químico no sistema de ensaio.

Recipientes e aparelhos

15. A exposição deve ter lugar em copos de vidro, por exemplo, de 250 ml e 6 cm de diâmetro. Podem utilizar-se outros recipientes, mas importa que assegurem uma espessura adequada de água sobrenadante e de sedimentos. Deve colocar-se em cada recipiente uma camada de 1,5 a 3 cm de sedimento formulado. O

▼M6

rácio entre a espessura da camada de sedimento e a espessura da água sobrenadante deve ser de 1:4. Os recipientes devem ter capacidade adequada à carga, isto é, ao número de minhocas utilizadas por unidade de peso do sedimento (ver também ponto 39).

16. Os recipientes de ensaio e o restante equipamento que entre em contacto com o produto químico em estudo devem ser exclusivamente de vidro ou de outro material quimicamente inerte. Deve evitar-se a utilização, em qualquer parte do equipamento, de materiais que possam dissolver ou absorver o produto químico em estudo ou permitir fugas de outros produtos químicos, ou que tenham um efeito nocivo nos animais sujeitos ao ensaio. Pode utilizar-se politetrafluoroetileno (PTFE), aço inoxidável e/ou vidro em qualquer equipamento que entre em contacto com os meios de ensaio. No caso de produtos químicos orgânicos que se saiba serem adsorvidos pelo vidro, pode ser necessário utilizar vidro silanizado. Em tais casos, o equipamento deve ser descartado após o uso.

Espécies sujeitas ao ensaio

17. A espécie utilizada neste tipo de estudo é o oligoqueta de água doce *Lumbriculus variegatus* (Müller). Esta espécie, tolerante a uma vasta gama de tipos de sedimentos, é amplamente utilizada em ensaios de bioacumulação e toxicidade de sedimentos [ver, por exemplo, (3) (5) (7) (9) (13) (15) (16) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34) (35)]. Devem comunicar-se a origem dos animais de ensaio, a confirmação da identidade da espécie [por exemplo, (36)] e as condições de cultura. Se os organismos forem provenientes de uma cultura interna do laboratório, não é necessário proceder à sua identificação antes de cada ensaio.

Cultura dos organismos a submeter a ensaio

18. A fim de dispor de um número suficiente de animais para a realização dos ensaios de toxicidade no sedimento, é útil manter uma cultura permanente de vermes no laboratório. O apêndice 5 contém orientações sobre métodos de cultura laboratorial de *Lumbriculus variegatus*, bem como fontes de culturas de arranque. Para mais informações sobre a cultura desta espécie, consultar as referências (3) (7) (27).

19. Para assegurar que os ensaios são realizados com animais da mesma espécie, recomenda-se vivamente a cultura de uma única espécie. Deve garantir-se que as culturas e, em especial, os animais utilizados nos ensaios são isentos de doenças ou perturbações observáveis.

Água

20. Nos ensaios, recomenda-se a utilização, como água sobrenadante, de água reconstituída [cf. capítulo C.1 (37)]; essa água pode também ser utilizada para a cultura laboratorial dos vermes (para a sua preparação, ver apêndice 2). Se necessário, pode utilizar-se água natural. A qualidade da água escolhida deve permitir que, durante os períodos de aclimatação e de ensaio, os vermes cresçam e se reproduzam sem apresentarem aspetos ou comportamentos anormais. Demonstrou-se que a espécie *Lumbriculus variegatus* sobrevive, desenvolve-se e reproduz-se neste tipo de água (30), pressupondo uma normalização máxima das condições de ensaio e cultura. Se se utilizar água reconstituída, a sua composição deve ser indicada. Antes da utilização, a água deve ser caracterizada, pelo menos, pelos seguintes parâmetros: pH, teor de oxigénio e dureza (expressos em mg $CaCO_3$/l). A análise da água, antes da utilização, para averiguar a presença de micropoluentes, pode proporcionar informações úteis (ver, por exemplo, apêndice 3).

21. O pH da água sobrenadante deve situar-se no intervalo de 6,0 a 9,0 (ver ponto 13). Caso se preveja um aumento da libertação de amoníaco, é conveniente manter o pH na gama de 6,0 a 8,0. Para o ensaio de ácidos orgânicos fracos, é conveniente ajustar o pH por tamponamento da água, como descrito, por exemplo, na referência (16). A dureza total da água a utilizar no ensaio deve situar-se entre 90 e 300 mg $CaCO_3$ por litro (água natural). O apêndice 3 resume os critérios adicionais que deve satisfazer uma água de diluição aceitável, em conformidade com a diretriz n.º 210 da OCDE (38).

▼M6

Sedimento

22. Uma vez que os sedimentos naturais não contaminados de uma dada origem podem não estar disponíveis todo o ano, e que a presença de organismos autóctones e de micropoluentes pode influenciar o ensaio, devem utilizar-se, de preferência, sedimentos formulados (também designados como reconstituídos, artificiais ou sintéticos). A utilização de sedimentos formulados minimiza a variabilidade das condições de ensaio e a introdução de fauna autóctone. Os sedimentos formulados cuja composição se segue baseiam-se nos sedimentos artificiais descritos em (6) (39) (40). Recomenda-se a sua utilização neste tipo de ensaio [(6) (10) (30) (41) (42) (43)]:

a) 4-5 % (peso seco) de turfa de esfagno; é importante utilizar turfa na forma pulverulenta, com grau de decomposição «médio», finamente moída (granulometria ≤ 0,5 mm) e seca unicamente ao ar.

b) 20 ± 1 % (peso seco) de argila caulínica, de preferência com teor de caulinite superior a 30 %;

c) 75-76 % (peso seco) de areia de quartzo (fina, com granulometria ≤ 2 mm, mas > 50 % das partículas na gama 50-200 μm).

d) Água desionizada, 30-50 % de sedimento (peso seco), além dos componentes secos do sedimento.

e) Carbonato de cálcio ($CaCO_3$) quimicamente puro, para ajustar o pH da mistura final do sedimento.

f) O teor de carbono orgânico da mistura final deve ser de 2 % (± 0,5 %) do peso seco do sedimento, ajustando-se o seu valor por recurso a quantidades adequadas de turfa e areia, em conformidade com as alíneas a) e c).

g) O alimento — por exemplo, folhas pulverizadas de ortiga (*Urtica* sp. para consumo humano, conforme com normas farmacêuticas) ou uma mistura de folhas pulverizadas de *Urtica* sp. com α-celulose (1:1), em 0,4-0,5 % de sedimento (peso seco), além dos componentes do sedimento seco; para mais informações, ver apêndice 4.

23. As fontes da turfa, da argila caulínica, do alimento e da areia devem ser conhecidas. Além da alínea g), o capítulo C.27 do presente anexo (6) enumera produtos de origem vegetal alternativos a utilizar como fonte de alimentação: folhas desidratadas de amoreira (*Morus alba*), trevo branco (*Trifolium repens*), espinafre (*Spinacia oleracea*) ou forragem de cereais.

24. O alimento escolhido deve ser adicionado antes ou durante o enriquecimento do sedimento com o produto químico em estudo. A fonte de alimentação deve permitir, pelo menos, uma reprodução aceitável nos controlos. A pesquisa de micropoluentes no sedimento artificial ou nos seus componentes, antes da utilização, pode proporcionar informações úteis. No apêndice 4, apresenta-se um exemplo de preparação do sedimento formulado. Também é aceitável uma mistura de componentes secos caso se demonstre que, após a adição da água sobrenadante, não ocorre separação de componentes dos sedimentos (por exemplo, partículas de turfa flutuantes) e que a turfa ou os sedimentos estão suficientemente acondicionados (ver também ponto 25 e apêndice 4). Os sedimentos artificiais devem ser caracterizados, pelo menos, pelos seguintes parâmetros: origem dos componentes, distribuição granulométrica (percentagem de areia, de limo e de argila), teor de carbono orgânico total (COT), teor de água e pH. A medição do potencial redox é facultativa.

25. Se necessário, nomeadamente para certas finalidades específicas, podem ser utilizados nos ensaios e/ou para cultura sedimentos naturais de locais não poluídos (3). Contudo, se se utilizarem sedimentos naturais, estes devem ser caracterizados, no mínimo, pelos seguintes parâmetros: origem (local de

▼M6

recolha), pH e teor de amoníaco da água dos poros, teor de carbono orgânico total (COT) e teor de azoto, distribuição granulométrica (percentagem de areia, de limo e de argila) e teor percentual de água (7); devem estar isentos de qualquer contaminação e de outros organismos que possam competir com os organismos sujeitos ao ensaio ou predá-los. A medição do potencial redox e da capacidade de troca catiónica é facultativa. Recomenda-se igualmente que, antes de ser enriquecido com o produto químico em estudo, o sedimento natural seja acondicionado durante sete dias em condições semelhantes às do ensaio subsequente. No final deste período de acondicionamento, remove-se e rejeita-se a água sobrenadante.

26. A qualidade do sedimento a utilizar deve permitir que, durante o período de exposição, os organismos de controlo sobrevivam e se reproduzam sem apresentarem características ou comportamentos anormais. Os animais de controlo devem enterrar-se no sedimento e ingeri-lo. A reprodução nos controlos deve satisfazer, pelo menos, o critério de validade descrito no ponto 13. Deve registar-se a presença ou ausência de péletes fecais à superfície dos sedimentos, indicativos da ingestão de sedimento pelos vermes, dado poderem ser úteis para a interpretação dos resultados do ensaio no que respeita às vias de exposição. Podem obter-se informações adicionais sobre a ingestão de sedimentos por recurso aos métodos descritos em (24) (25) (44) (45), que especificam a ingestão de sedimentos e a seleção de partículas pelos organismos de ensaio.

27. Os procedimentos de manipulação dos sedimentos naturais antes da sua utilização no laboratório são descritos em (3) (7) (12). A preparação e a armazenagem dos sedimentos artificiais cuja utilização é recomendada no ensaio com *Lumbriculus* são descritas no apêndice 4.

Aplicação do produto químico em estudo

28. O produto químico em estudo é incorporado no solo. É de prever que a maioria dos produtos químicos em estudo tenha baixa solubilidade em água; por isso, devem ser dissolvidos num solvente orgânico adequado (por exemplo, acetona, *n*-hexano, ciclo-hexano) com volume tão baixo quanto possível para preparar a solução de reserva. Esta solução deve ser diluída com o mesmo solvente utilizado na preparação das soluções de ensaio. A toxicidade e a volatilidade do solvente e a solubilidade do produto químico em estudo no solvente escolhido devem ser os principais critérios para a seleção de um agente solubilizante adequado. Para cada concentração, deve utilizar-se o mesmo volume da solução correspondente. O sedimento deve ser enriquecido em abundância para cada concentração, a fim de minimizar a variabilidade da concentração do produto químico em estudo entre replicados. Mistura-se então cada uma das soluções de ensaio com areia de quartzo, do modo descrito no ponto 22 (por exemplo, 10 g de areia por recipiente de ensaio). Para embeber completamente a areia, considera-se suficiente um volume de 0,20 a 0,25 ml por g de areia. De seguida, é necessário evaporar o solvente à secura. Para minimizar as perdas do produto químico em estudo por coevaporação (devido à pressão de vapor do produto), a areia impregnada deve ser utilizada imediatamente após a secagem. A areia seca é misturada com a quantidade adequada de sedimento formulado correspondente à concentração em causa. Ao preparar o sedimento, importa ter em conta a quantidade de areia misturada com o produto químico em estudo (ou seja, deve utilizar-se menos areia na preparação do sedimento). A principal vantagem deste procedimento consiste em que não se introduz praticamente nenhum solvente no sedimento (7). Em alternativa (por exemplo, no caso de sedimentos recolhidos no campo), o produto químico em estudo pode ser adicionado, pelo método atrás descrito para a areia de quartzo, a uma porção de sedimento seco e finamente moído ou misturado no solo húmido, com subsequente evaporação do agente solubilizante eventualmente utilizado. Deve ter-se o cuidado de assegurar a distribuição total e uniforme do produto químico no sedimento. Se necessário, podem analisar-se subamostras, a fim de confirmar as concentrações-alvo no sedimento e determinar o grau de

▼M6

homogeneidade. Pode também ser útil analisar subamostras das soluções de ensaio, para confirmar as concentrações-alvo no sedimento. Uma vez que se recorre a um solvente para impregnar a areia de quartzo com o produto químico em estudo, deve utilizar-se um controlo com solvente, preparado com uma quantidade de solvente igual à dos sedimentos de ensaio. Deve indicar-se o método utilizado para o enriquecimento, bem como as razões da escolha de um procedimento de enriquecimento diverso do descrito. O método de enriquecimento pode ser adaptado às propriedades físico-químicas do produto em estudo, nomeadamente para evitar perdas por volatilização durante o enriquecimento ou a fase de equilíbrio. O documento *Environment Canada* (1995) (46) fornece orientações adicionais sobre os procedimentos de enriquecimento.

29. Quando o sedimento enriquecido estiver preparado, distribuído pelos recipientes de replicação e coberto com a água de ensaio, é conveniente permitir a partição do produto químico em estudo entre o sedimento e a fase aquosa [ver, por exemplo, (3) (7) (9)]. Esta partição deve ocorrer, de preferência, às condições de temperatura e arejamento utilizadas no ensaio. O tempo necessário para atingir o equilíbrio depende do sedimento e do produto químico, podendo variar de algumas horas a vários dias e mesmo, em casos raros, a 4 ou 5 semanas [ver, por exemplo, (27) (47)]. No presente ensaio, não se pretende atingir o equilíbrio, mas recomenda-se um período de equilibração de 48 horas a 7 dias. Minimiza-se, assim, o tempo necessário à degradação do produto químico em estudo. Consoante o objetivo do estudo (por exemplo, se for necessário simular condições ambientais), os sedimentos enriquecidos podem ser equilibrados ou «envelhecidos» por um período mais longo.

30. No final do período de equilibração, devem ser colhidas, no mínimo, amostras da água sobrenadante e do sedimento a granel, pelo menos nas concentrações mais elevada e mais baixa, para análise da concentração do produto químico em estudo. Estas determinações analíticas do produto químico em estudo permitem o cálculo do balanço de massas e a expressão dos resultados com base nas concentrações iniciais medidas. Em geral, a amostragem perturba ou destrói o sistema sedimento/água. Por conseguinte, não é, em geral, possível utilizar os mesmos replicados para a colheita de amostras de sedimentos e de animais. Devem preparar-se para análise recipientes adicionais de dimensões adequadas, que são tratados da mesma forma (inclusive no que respeita à presença dos organismos de ensaio), mas não se utilizam para observações biológicas. As dimensões dos recipientes devem ser selecionadas de forma a poderem ser produzidas as quantidades de amostras requeridas pelo método analítico. O ponto 53 contém mais informação sobre as técnicas de amostragem.

REALIZAÇÃO DO ENSAIO

Ensaio preliminar

31. Se não se dispuser de informações sobre a toxicidade do produto químico em estudo para a *Lumbriculus variegatus*, pode ser útil efetuar um ensaio preliminar para determinar a gama de concentrações a utilizar no ensaio definitivo e para otimizar as condições do ensaio definitivo. Para o efeito, recorre-se a uma série de concentrações espaçadas do produto químico em estudo. Os vermes são expostos às várias concentrações do produto químico por um período que permita estimar as concentrações de ensaio adequadas (por exemplo, 28 dias, como no ensaio definitivo); não são necessários replicados. Nos ensaios preliminares, importa observar e registar quaisquer comportamentos dos vermes — por exemplo, o evitarem o sedimento — que possam ser causados pelo produto químico em estudo e/ou pelo sedimento. Não se devem utilizar no ensaio preliminar concentrações superiores a 1 000 mg/kg de peso seco de sedimento.

Ensaio definitivo

32. No ensaio definitivo, devem utilizar-se, pelo menos, cinco concentrações, selecionadas, por exemplo, com base nos resultados do ensaio preliminar (ponto 31) e em conformidade com os pontos 35, 36, 37 e 38.

▼M6

33. Além das séries de ensaio, deve preparar-se uma amostra de controlo (no que respeita aos replicados, ver pontos 36, 37 e 38) com todos os componentes, exceto o produto químico em estudo. Se, para a aplicação do produto químico em estudo, for utilizado um agente solubilizante, este não deve ter efeitos significativos nos organismos de ensaio, revelados por recurso a outra amostra de controlo contendo apenas o solvente.

Planeamento do ensaio

34. O planeamento do ensaio consiste na escolha do número e dos intervalos das concentrações de ensaio, do número de recipientes para cada concentração e do número de minhocas colocadas em cada recipiente. Os procedimentos para a estimativa da EC_x e da NOEC, bem como para a realização de ensaios do limite, são descritos nos pontos 35, 36, 37 e 38.

35. As concentrações testadas no ensaio devem incluir as concentrações às quais se observam efeitos (por exemplo, EC_{50}, EC_{25}, EC_{10}) e abranger a gama de concentrações para as quais os efeitos do produto químico em estudo são significativos. Devem evitar-se extrapolações muito abaixo da menor concentração que afeta os organismos de ensaio ou muito acima da concentração de ensaio mais elevada. Se — excecionalmente — se efetuar uma tal extrapolação, é necessário apresentar uma justificação pormenorizada no relatório.

36. Caso se pretenda estimar a EC_x, devem utilizar-se, pelo menos, cinco concentrações e três replicados de cada concentração; para melhorar a estimativa da variabilidade, recomenda-se a utilização de seis replicados para o controlo ou, se for caso disso, o controlo com solvente. Em qualquer caso, para obter uma boa estimativa, é aconselhável ensaiar um número suficiente de concentrações. O fator entre as concentrações não deve ser superior a 2, salvo se a curva de resposta à concentração tiver declive reduzido. Pode reduzir-se o número de replicados de cada concentração se se aumentar o número de concentrações de ensaio com respostas na gama 5-95 %. O aumento do número de replicados ou a redução dos intervalos entre concentrações produz, em geral, intervalos de confiança mais estreitos.

37. Caso se pretenda estimar os valores da LOEC ou da NOEC, devem utilizar-se, pelo menos, cinco concentrações de ensaio, com um mínimo de quatro replicados (para melhorar a estimativa da variabilidade, recomenda-se a utilização de seis replicados para o controlo ou, se for caso disso, o controlo com solvente), não devendo o fator entre as concentrações ser superior a 2. O apêndice 6 apresenta algumas informações sobre a representatividade estatística observada nos testes de hipóteses no contexto do estudo interlaboratorial comparativo do método de ensaio.

38. Pode ser efetuado um ensaio do limite (utilizando uma concentração de ensaio e os respetivos controlos) se não se previrem efeitos a concentrações da ordem de 1 000 mg/kg de sedimentos (peso seco) (por exemplo, de um ensaio preliminar de determinação da gama de concentrações) ou se o ensaio a uma única concentração for adequado para confirmar um valor significativo da NOEC. Neste último caso, o relatório do ensaio deve incluir uma justificação pormenorizada da escolha da concentração-limite. O objetivo consiste em realizar um ensaio com uma concentração suficientemente elevada para permitir aos decisores excluir a possibilidade de efeitos tóxicos do produto químico em estudo, sendo o limite fixado a uma concentração cuja ocorrência não se prevê em caso algum. Recomenda-se a utilização de 1 000 mg/kg (peso seco). Em geral, são necessários, pelo menos, seis replicados dos organismos expostos e de controlo. O apêndice 6 apresenta algumas informações sobre a representatividade estatística observada nos testes de hipóteses no contexto do estudo interlaboratorial comparativo do método de ensaio.

Condições de exposição

Organismos sujeitos aos ensaios

39. O ensaio é realizado com um mínimo de 10 animais por cada replicado utilizado para a determinação dos parâmetros biológicos. Este número de animais corresponde a cerca de 50-100 mg de biomassa húmida. Pressupondo um teor de biomassa seca de 17,1 % (48), obtém-se aproximadamente

▼M6

9-17 mg de biomassa seca por recipiente. A EPA dos EUA (2000 (7)) recomenda a utilização de uma taxa de carga não superior a 1:50 (biomassa seca: COT). Para os sedimentos formulados descritos no ponto 22, este valor corresponde a cerca de 43 g de sedimento (peso seco) por 10 animais, com um teor de COT de 2,0 % do sedimento seco. Nos casos em que são utilizados mais de 10 animais por recipiente, a quantidade de sedimentos e de água sobrenadante deve ser ajustada em conformidade.

40. Os vermes utilizados num ensaio devem provir da mesma fonte e encontrar-se num estado fisiológico semelhante (ver apêndice 5). Devem selecionar-se animais de dimensões semelhantes (ver ponto 39). Recomenda-se a pesagem de uma subamostra do lote de vermes, de modo a calcular o peso médio.

41. Os vermes a utilizar no ensaio são retirados da cultura (ver apêndice 5 para mais pormenores). Os animais de maiores dimensões (adultos) que não mostrem sinais de fragmentação recente são transferidos para placas de vidro (por exemplo, placas de Petri) contendo água limpa. São posteriormente sincronizados como descrito no apêndice 5. Após regeneração por um período de 10 a 14 dias, devem utilizar-se para o ensaio animais completos e intactos de dimensões semelhantes, que nadem ou rastejem ativamente após um ligeiro estímulo mecânico. Se as condições de ensaio diferirem das condições de cultura (nomeadamente no que respeita à temperatura, ao regime de iluminação e à fase aquosa sobrenadante), deverá bastar para adaptar os vermes às condições de ensaio uma fase de aclimatação de, por exemplo 24 h, às mesmas condições de temperatura e iluminação e utilizando a mesma água sobrenadante que no ensaio. Os oligoquetas adaptados devem ser repartidos de forma aleatória pelos recipientes de ensaio.

Alimentação

42. Uma vez que os alimentos são adicionados aos sedimentos antes (ou durante) a aplicação do produto químico em estudo, não são fornecidos mais alimentos aos animais durante o ensaio.

Luz e temperatura

43. O período de exposição à luz da cultura e do ensaio é, geralmente, de 16 horas (3) (7). A intensidade luminosa deve ser mantida a níveis baixos (por exemplo, 100-500 lx), de forma a imitar as condições naturais à superfície dos sedimentos, e medida, pelo menos, uma vez durante o período de exposição. A temperatura deve ser de 20 ± 2 °C ao longo de todo o ensaio. Numa determinada data de medição, a diferença de temperatura entre recipientes de ensaio não deverá ser superior a ±1 °C. Os recipientes de ensaio devem ser colocados na incubadora ou na zona de ensaio de uma forma aleatória, por exemplo, para minimizar condicionalismos na reprodução decorrentes da localização dos recipientes.

Arejamento

44. A água sobrenadante dos recipientes de ensaio deve ser ligeiramente arejada (por exemplo, 2-4 bolhas por segundo) por recurso a uma pipeta de Pasteur, posicionada cerca de 2 cm acima da superfície do sedimento, de modo a minimizar a perturbação deste. Deve evitar-se que a concentração de oxigénio dissolvido seja inferior a 30 % do valor da saturação com ar (VSA). O fornecimento de ar deve ser controlado e, se necessário, ajustado, pelo menos, uma vez por dia, nos dias de ensaio.

Qualidade da água

45. Devem ser medidos os seguintes parâmetros de qualidade da água sobrenadante:

Temperatura	Pelo menos um recipiente de ensaio de cada concentração e um recipiente de ensaio de controlo, uma vez por semana e no início e no final do período de exposição; se possível, deve também registar-se a temperatura do meio circundante (ar ambiente ou banho-maria), por exemplo, com uma periodicidade horária;

▼M6

Teor de oxigénio dissolvido	Pelo menos um recipiente de ensaio de cada concentração e um recipiente de ensaio de controlo, uma vez por semana e no início e no final do período de exposição; expresso em mg/l e em % VSA (valor da saturação com ar);
Fornecimento de ar	Deve ser controlado, pelo menos, uma vez por dia, durante o ensaio e, se necessário, ajustada;
pH	Pelo menos um recipiente de ensaio de cada concentração e um recipiente de ensaio de controlo, uma vez por semana e no início e no final do período de exposição;
Dureza total da água	Pelo menos, num replicado dos controlos e num recipiente de ensaio à concentração mais elevada, no início e no final do período de exposição; expressa em mg/l $CaCO_3$;
Teor de amoníaco total	Pelo menos, num replicado dos controlos e num recipiente de ensaio a cada concentração, no início do período de exposição e, posteriormente, três vezes por semana; expresso em mg/l NH_4^+, NH_3 ou azoto amoniacal total.

Se a medição dos parâmetros de qualidade da água implicar a colheita de amostras importantes de água dos recipientes, pode ser aconselhável dispor de recipientes separados para as medições da qualidade da água, para não alterar o rácio volúmico água-sedimento.

Observações biológicas

46. Durante a exposição, os recipientes de ensaio devem ser observados a fim de identificar visualmente quaisquer anomalias comportamentais nos vermes (por exemplo, fuga dos sedimentos, deposição de péletes fecais à superfície destes) em comparação com os controlos. As observações devem ser registadas.

47. No final do ensaio, procede-se ao exame de cada replicado (os recipientes suplementares destinados à análise química podem ser excluídos do exame). Deve utilizar-se um método adequado para retirar todos os vermes do recipiente de ensaio. Devem tomar-se precauções para que todos os vermes sejam recuperados sem danos. Um dos métodos possíveis consiste na crivagem dos vermes a partir do sedimento. Pode utilizar-se um crivo de aço inoxidável com malha de dimensão adequada. A maior parte da água sobrenadante é decantada cuidadosamente; a parte restante do sedimento e da água é agitada para formar uma lama que possa passar através do crivo. Utilizando uma malha de 500 μm, a maior parte das partículas de sedimentos passa pelo crivo com grande facilidade; no entanto, a crivagem deve ser feita rapidamente, para evitar que os vermes escapem para a malha ou através desta. Uma malha de 250 μm impedirá que os vermes escapem para a malha ou através desta; deve contudo, agir-se de forma a que fique retida na malha a menor quantidade possível de partículas de sedimento. A lama crivada de recipiente replicado pode passar pelo crivo uma segunda vez, a fim de assegurar que todos os vermes são recuperados. Um método alternativo consiste no aquecimento do sedimento por colocação dos recipientes de ensaio num banho-maria a 50-60 °C; nessas condições, os vermes abandonam o sedimento e podem ser recolhidos da superfície deste por meio de uma pipeta de boca larga polida à chama. Outro método alternativo consiste em produzir uma lama de sedimento e vertê-la numa superfície rasa de dimensão adequada. Os vermes podem ser retirados da camada fina de lama por recurso a uma agulha de aço ou uma pinça de relojoeiro (a utilizar como um garfo em vez de um fórceps, para evitar causar danos aos vermes) e transferidos para água limpa. Os vermes retirados da lama são lavados com o meio de ensaio e contados.

48. Independentemente do método utilizado, os laboratórios devem demonstrar que o seu pessoal tem capacidade para recolher, em média, pelo menos 90 % dos organismos da quantidade total de sedimentos. Pode,

▼M6

por exemplo, adicionar-se um determinado número de organismos de ensaio ao sedimento ou aos sedimentos de ensaio, determinando-se a recuperação após 1 hora (7).

49. Importa avaliar e registar o número total de indivíduos vivos e mortos por replicado. Os vermes são considerados mortos nos seguintes casos:

a) Ausência de reação a um ligeiro estímulo mecânico;

b) Existência de sinais de decomposição [juntamente com «a)»]

c) Vermes em falta.

Além disso, os vermes vivos podem ser repartidos por três grupos:

a) Vermes completos de grandes dimensões (adultos), que não exibam partes do corpo regeneradas;

b) Vermes completos com partes do corpo regeneradas (ou seja, partes posteriores regeneradas, partes anteriores regeneradas ou ambas as partes regeneradas), que exibem uma coloração mais clara;

c) Vermes incompletos (ou seja, recentemente fragmentados, com partes do corpo não regeneradas)

Estas observações adicionais não são obrigatórias, mas podem ser utilizadas para uma interpretação complementar dos resultados biológicos (por exemplo, a existência de um elevado número de vermes classificados no grupo C pode indicar um atraso na reprodução ou na regeneração, na exposição a um determinado produto). Além disso, devem registar-se quaisquer eventuais diferenças de aspeto (por exemplo, lesões no tegumento, edemas em determinadas partes do corpo) entre os vermes expostos ao produto químico em estudo e os vermes de controlo.

50. Imediatamente após a contagem ou a avaliação, os animais vivos presentes em cada replicado são transferidos para cápsulas de pesagem secas, taradas e rotuladas (uma cápsula por replicado) e mortos por adição de uma gota de etanol por recipiente de pesagem. As cápsulas são colocadas de um dia para o outro numa estufa a 100 ± 5 °C, para secagem, sendo pesadas após arrefecimento num exsicador, após o que se determina o peso seco (de preferência em gramas, com, pelo menos, 4 casas decimais).

51. Além do peso seco total, pode determinar-se o peso seco isento de cinzas, como descrito em (49), a fim de ter em conta os componentes inorgânicos provenientes de sedimentos ingeridos presentes no tubo digestivo dos vermes.

52. A biomassa é determinada na forma de biomassa total por replicado, incluindo vermes adultos e jovens. Os vermes mortos não devem ser tidos em conta para efeitos de determinação da biomassa por replicado.

Verificação da concentração do produto químico em estudo

Amostragem

53. Devem colher-se amostras para análise química do produto químico em estudo, pelo menos, à concentração máxima e a uma concentração menor, pelo menos, no final da fase de equilibração (antes da introdução dos organismos de ensaio) e no final do ensaio. Devem colher-se amostras, pelo menos, do sedimento a granel e da água sobrenadante, para análise. Devem colher-se, pelo menos, duas amostras por matriz e amostra de tratamento, para cada data de amostragem. Uma das amostras em duplicado pode ser guardada como reserva (para análise, por exemplo, caso o resultado da primeira análise se situe fora da gama de ± 20 % da concentração nominal). Em caso de propriedades químicas específicas, nomeadamente

▼M6

se for de prever uma degradação rápida do produto químico em estudo, o calendário analítico pode ser refinado (por exemplo, amostragem mais frequente, análise de mais concentrações), com base numa análise circunstanciada. Nesse caso, as amostras podem ser colhidas em datas intermédias — por exemplo, no sétimo dia após o início da exposição.

54. As amostras de água sobrenadante devem ser colhidas por decantação ou sifonagem cuidadosas, de forma a minimizar perturbações do sedimento. Deve registar-se o volume das amostras.

55. Após a colheita de amostras de água sobrenadante, o sedimento deve ser homogeneizado e transferido para um recipiente adequado. Regista-se o peso da amostra de sedimento húmido.

56. Se for também necessário proceder à análise do produto químico em estudo na água dos poros, as amostras de sedimento homogeneizadas e pesadas devem ser centrifugadas, para extração da água em causa. Pode, por exemplo, introduzir-se cerca de 200 ml de sedimento húmido em frascos de centrifugação de 250 ml. Em seguida, as amostras são centrifugadas, sem filtração, para isolar a água dos poros, por exemplo, a 10 000 ± 600 x *g*, durante 30 a 60 minutos, a uma temperatura que não exceda a temperatura de ensaio. Após a centrifugação, o sobrenadante é decantado ou pipetado cuidadosamente, para que não sejam introduzidas partículas de sedimentos, e regista-se o volume. Regista-se também o peso das péletes de sedimento remanescentes, que pode facilitar a estimativa do balanço de massas ou da recuperação do produto químico em estudo no sistema água-sedimento, caso o peso a seco do sedimento seja determinado em cada data de amostragem. Em alguns casos, se a amostra for demasiado pequena, poderá não ser possível analisar as concentrações da água dos poros.

57. Caso não se proceda à análise imediata, as amostras devem ser armazenadas por um método adequado, por exemplo, nas condições de armazenamento recomendadas com vista a uma degradação mínima do produto químico em estudo (geralmente a – 18 °C, na obscuridade). Antes de iniciar o estudo, devem obter-se informações sobre as condições de armazenagem adequadas ao produto químico em causa, nomeadamente duração e temperatura, processos de extração, etc.

Método analítico

58. Uma vez que o processo global é condicionado essencialmente pela exatidão, precisão e sensibilidade do método analítico utilizado, deve comprovar-se experimentalmente a adequação ao mesmo da precisão e reprodutibilidade deste último, bem como do método de recuperação do produto químico em estudo a partir de amostras de água e dos sedimentos, pelo menos, às concentrações de ensaio mais baixa e mais elevada. É também necessário verificar que, nos recipientes de controlo, o produto químico em estudo não é detetável em concentrações superiores ao limite de quantificação. Se necessário, corrigir a concentração nominal para as recuperações dos picos de controlo de qualidade — por exemplo, se a recuperação estiver fora da gama de 80-120 % da quantidade enriquecida. Ao longo de todo o ensaio, as amostras devem ser manipuladas de modo a minimizar contaminações e perdas, resultantes, por exemplo, da adsorção do produto químico em estudo no dispositivo de colheita das amostras.

59. A recuperação do produto químico em estudo, o limite de quantificação e o limite de deteção nos sedimentos e na água devem ser registados e comunicados.

DADOS E RELATÓRIOS

Tratamento dos resultados

60. As principais variáveis de resposta a que devem obrigatoriamente ser objeto de avaliação estatística são a biomassa e o número total de vermes por replicado. A título facultativo, podem também avaliar-se a reprodução (aumento do número de vermes) e o crescimento (aumento de biomassa seca). Neste caso, importa obter uma estimativa do peso seco dos vermes no início da exposição, nomeadamente por medição do peso seco de uma subamostra representativa do lote de vermes sincronizados utilizado no ensaio.

▼M6

61. Embora a mortalidade não constitua um ponto final do ensaio, deve ser estimada sempre que possível. Para tal, consideram-se mortos os vermes que não reagirem a um ligeiro estímulo mecânico ou revelem sinais de decomposição, bem como os vermes ausentes. A mortalidade deve, no mínimo, ser registada e tida em conta na interpretação dos resultados dos ensaios.

62. As concentrações com efeitos são expressas em mg/kg de massa seca de sedimento. Se a recuperação do produto químico determinada nos sedimentos, ou nos sedimentos e da água sobrenadante, no início da exposição se situar entre 80 e 120 % da concentração nominal, as concentrações com efeitos (EC_x, LOEC, NOEC) podem ser expressas em concentrações nominais. Se a recuperação se desviar da concentração nominal em mais de ± 20 %, as concentrações sem efeitos (EC_x, NOEC, LOEC) devem basear-se nas as concentrações medidas no início da exposição, tendo em conta, nomeadamente, o balanço de massas do produto químico em estudo no sistema de ensaio (ver ponto 30). Nestes casos, podem obter-se informações complementares a partir da análise da solução de reserva e/ou das soluções aplicadas, para confirmar que os sedimentos de ensaio foram preparados de forma correta.

EC_x

63. Os valores dos parâmetros EC_x, descritos no ponto 60 são calculados por recurso a métodos estatísticos adequados (análise da função probit, função logística ou de Weibull, método abreviado de Spearman-Karber ou simples interpolação). Para mais orientações a avaliação estatística, consultar as referências bibliográficas (15) (50). Determina-se a EC_x inserindo o valor correspondente a x % da média do grupo de controlo na equação obtida. Para calcular a EC_{50} ou qualquer outra EC_x, procede-se a uma análise de regressão da média das séries ($\overline{X}$).

NOEC/LOEC

64. Caso se pretenda determinar a NOEC ou LOEC por análise estatística, é necessário dispor de dados estatísticos por recipiente (sendo cada recipiente considerado um replicado). Devem utilizar-se métodos estatísticos adequados. Em geral, investigam-se os efeitos nocivos do produto químico em estudo, comparativamente ao grupo de controlo, testando a hipótese unilateral (mais reduzida) para $p \leq 0,05$. Os pontos que se seguem apresentam vários exemplos. As referências bibliográficas (15) (50) fornecem orientações para a seleção dos métodos estatísticos adequados.

65. A distribuição normal dos dados pode ser sujeita, por exemplo, ao teste de ajustamento de Kolmogorov-Smirnov, ao teste de rácio gama-desvio padrão (teste R/s) ou ao teste dual de Shapiro-Wilk ($p \leq 0,05$). Para avaliar a homogeneidade da variância, pode recorrer-se aos testes de Cochran, de Levene ou de Bartlett (dual, $p \leq 0,05$). Se forem cumpridos as requisitos dos testes paramétricos (normalidade homogeneidade da variância), podem realizar-se uma análise ANOVA e os testes multicomparativos subsequentes. Para averiguar se existem diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os controlos e a várias concentrações de ensaio do produto, podem utilizar-se, comparações par-a-par (por exemplo, teste de Dunnett) ou testes de tendência regressiva (epor exemplo, teste de Williams). Alternativamente, pode recorrer-se a métodos não paramétricos (por exemplo, teste U de Bonferroni na versão de Holm ou teste de tendências de Jonckheere-Terpstra) para determinar a NOEC ou a LOEC.

Ensaio do limite

66. Se for realizado um ensaio do limite (comparação de apenas uma amostra de controlo e uma amostra tratada com o produto) e forem cumpridos os requisitos dos testes paramétricos (normalidade homogeneidade), as respostas métricas (número total de vermes e biomassa, expressa na massa seca de vermes) podem ser avaliadas por um teste t de Student. Se estes requisitos não forem preenchidos, pode recorrer-se a um teste t de variância desigual (teste de Welch) ou a um teste não paramétrico, como o teste U de Mann-Whitney. O apêndice 6 apresenta algumas informações sobre a representatividade estatística observada nos testes de hipóteses no contexto do estudo interlaboratorial comparativo do método de ensaio.

▼M6

67. Para detetar diferenças significativas entre os controlos (ensaio de controlo e controlo do solvente), os replicados de cada controlo podem ser testados da forma descrita para o ensaio do limite. Se esses testes não detetarem diferenças significativas, podem agrupar-se todos replicados. Caso contrário, todas as amostras tratadas com o produto devem ser comparadas com o controlo com solvente.

Interpretação dos resultados

68. Os resultados devem ser interpretados com precaução caso se tenham registado desvios ao presente método de ensaio e sempre que as concentrações determinadas das soluções de ensaio sejam próximas do limite de deteção do método analítico utilizado. Devem indicar-se quaisquer desvios em relação ao presente método de ensaio.

Relatório de ensaio

69. O relatório de ensaio deve incluir pelo menos as seguintes informações:

— *Produto químico em estudo:*

— dados de identificação química (denominação comum, denominação química, fórmula estrutural, número CAS, etc.), incluindo o grau de pureza e o método analítico de quantificação do produto químico em estudo; proveniência do produto químico em estudo, identidade e concentração dos solventes eventualmente utilizados;

— quaisquer informações disponíveis sobre a natureza física e as propriedades físico-químicas, obtidas antes do início do ensaio — por exemplo, hidrossolubilidade, pressão de vapor, coeficiente de partição no solo (ou nos sedimentos, se disponível), log K_{ow}, estabilidade na água, etc.;

— *Espécies sujeitas a ensaio:*

— denominação científica, origem, pré-tratamentos eventuais, aclimatação, condições de cultura, etc.

— *Condições de ensaio:*

— procedimento de ensaio utilizado (estático, semiestático ou contínuo);

— conceção do ensaio (número, material constituinte e dimensões das células de ensaio, volume de água por recipiente, massa e volume de sedimento por recipiente; no caso dos ensaios dinâmicos ou semiestáticos, taxa de renovação do volume de água), eventual arejamento utilizado antes e durante o ensaio, número de replicados, número de vermes por replicado no início da exposição, número de concentrações de ensaio, duração do condicionamento, períodos de equilibração e de exposição, frequência da colheita de amostras);

— espessura dos sedimentos e da água sobrenadante;

— método de pré-tratamento e de enriquecimento ou aplicação do produto químico em estudo;

— concentrações de ensaio nominais, pormenores sobre a colheita de amostras para análise química, métodos analíticos através dos quais foram obtidas as concentrações do produto químico em estudo;

— características dos sedimentos, como descrito nos ponto 24-25, e quaisquer outras medições efetuadas; preparação dos sedimentos formulados;

— preparação da água para o ensaio — caso seja utilizada água reconstituída — e respetivas características (concentração de oxigénio, pH, condutividade, dureza e quaisquer outros parâmetros medidos) antes do início do ensaio;

— informações pormenorizadas sobre a alimentação dos organismos, incluindo o tipo de alimentos, a preparação, a quantidade e o regime alimentar;

▼M6

— intensidade luminosa e período(s) de iluminação;

— métodos utilizados para a determinação de todos os parâmetros biológicos (por exemplo, para a amostragem, inspeção e pesagem dos organismos de ensaio) e de todos os parâmetros abióticos (por exemplo, os parâmetros de qualidade da água e dos sedimentos);

— volume e/ou peso de todas as amostras para análise química;

— explicação detalhada do tratamento de todas as amostras para análise química, incluindo pormenores sobre a preparação, a armazenagem, os procedimentos de enriquecimento do solo com o produto químico em estudo, a extração, os procedimentos de análise do produto químico (com a respetiva precisão) e a recuperação do mesmo.

— *Resultados:*

— qualidade da água nos recipientes de ensaio (pH, temperatura, concentração de oxigénio dissolvido, dureza, concentração de amoníaco e quaisquer outros parâmetros medidos);

— teor de carbono orgânico total (COT), rácio massa seca/massa húmida, pH dos sedimentos e quaisquer outros parâmetros medidos;

— número total e, se determinado, número de vermes completos e incompletos em cada câmara de ensaio, no final do mesmo;

— peso seco dos vermes em cada câmara de ensaio no final do ensaio, e caso tenha sido medido, o peso seco de uma subamostra dos vermes no início do ensaio;

— qualquer comportamento anómalo em comparação com os controlos (por exemplo, fuga dos sedimentos, presença ou ausência de péletes fecais);

— mortalidade observada;

— estimativas de parâmetros de toxicidade, (por exemplo EC_x, NOEC e/ou LOEC) e métodos estatísticos utilizados para a sua determinação;

— concentrações de ensaio nominais, concentrações de ensaio medidas e resultados de todas as análises efetuadas para determinar a concentração do produto químico em estudo nos recipientes de ensaio;

— quaisquer desvios aos critérios de validade.

— *Avaliação dos resultados:*

— coerência dos resultados com os critérios de validade referidos no ponto 13;

— discussão dos resultados, incluindo qualquer influência sobre os resultado do ensaio que decorra das alterações em relação ao presente método de ensaio.

REFERÊNCIAS

(1) OCDE (2003). Documento técnico de orientação sobre a Diretiva 93/67/CEE da Comissão que estabelece os princípios para a avaliação dos riscos para o homem e para o ambiente das substâncias notificadas em conformidade com a Directiva 67/548/CEE do Conselho, o Regulamento (CE) n.º 1488/94 da Comissão que estabelece os princípios para a avaliação dos riscos para o homem e para o ambiente associados às substâncias existentes e a Diretiva 98/8/EC do Parlamento Europeu e do Conselho relativa à colocação de produtos biocidas no mercado; partes I-IV. Serviço de Publicações da UE, Luxemburgo.

(2) OCDE (1992a). Report of the OECD workshop on effects assessment of chemicals in sediment. OECD Monographs No. 60. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris.

▼M6

(3) ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(4) ASTM International (2002). Standard Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, E1706-00. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(5) Phipps, G.L., Ankley, G.T., Benoit, D.A. & Mattson, V.R. (1993). Use of the aquatic Oligochaete *Lumbriculus variegatus* for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. Environ.Toxicol. Chem. 12, 269-279.

(6) Capítulo C.27 do presente anexo (Ensaio de toxicidade em quironomídeos num sistema sedimentos-água com sedimentos enriquecidos).

(7) U.S. EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.

(8) Environment Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. December 1997.

(9) Hill, I. R., Matthiessen, P., Heimbach, F. (eds), 1993, Guidance document on Sediment Toxicity Tests and Bioassays for freshwater and Marine Environments, From the SETAC-Europe Workshop On Sediment Toxicity Assessment, 8-10 November 1993, Renesse (NL).

(10) OCDE (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke & H.Köpp. Berlin 1995.

(11) Riedhammer C. & B. Schwarz-Schulz (2001). The Newly Proposed EU Risk Assessment Concept for the Sediment Compartment. J. Soils Sediments 1(2), 105-110.

(12) ASTM International (2004). Standard guide for collection, storage, characterisation, and manipulation of sediment for toxicological testing and for selection of samplers used to collect benthic invertebrates. American Society for Testing and Materials, E 1391-03.

(13) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 20267429

(14) OCDE (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

(15) Environment Canada (2003). Guidance Document on Statistical Methods for Environmental Toxicity Tests; fifth draft, March 2003; Report EPS 1/RM/

(16) Nikkilä A., Halme A., Kukkonen J.V.K. (2003). Toxicokinetics, toxicity and lethal body residues of two chlorophenols in the oligochaete worm, *Lumbriculus variegatus*, in different sediments. Chemosphere 51: 35-46.

(17) Baily H.C., & Liu D.H.W. (1980). *Lumbriculus variegatus*, a Benthic Oligochaete, as a Bioassay Organism. p. 205-215. In J.C. Eaton, P.R. Parrish, & A.C. Hendricks (eds). Aquatic Toxicology, ASTM STP 707. American Society for Testing and Materials.

▼**M6**

(18) Chapman K. K., Benton M. J., Brinkhurst R. O. & Scheuerman P. R. (1999). Use of the aquatic oligochaetes *Lumbriculus variegatus* and *Tubifex tubifex* for assessing the toxicity of copper and cadmium in a spiked-artificial-sediment toxicity test. Environmental Toxicology. 14; 2 1556-1557.

(19) Meyer J.S., Boese C.J. & Collyard S.A. (2002). Whole-body accumulation of copper predicts acute toxicity to an aquatic oligochaete (*Lumbriculus variegatus*) as pH and calcium are varied. Comp. Biochem. Physiol. Part C 133:99-109.

(20) Schubauer-Berigan M.K., Dierkes J.R., Monson P.D. & Ankley G.T. (1993). pH-dependent toxicity of cadmium, copper, nickel, lead and zinc to *Ceriodaphnia dubia*, *Pimephales promelas*, *Hyalella azteca* and *Lumbriculus variegatus*. Environ. Toxciol. Chem. 12(7):1261-1266.

(21) West, C.W., V.R. Mattson, E.N. Leonard, G.L. Phipps & G.T. Ankley (1993). Comparison of the relative sensitivity of three benthic invertebrates to copper-contaminated sediments from the Keweenaw Waterway. Hydrobiol. 26257-63

(22) Ingersoll, C.G., Ankley, G.T., Benoit D.A., Brunson, E.L., Burton, G.A., Dwyer, F.J., Hoke, R.A., Landrum, P. F., Norberg-King, T. J. and Winger, P.V. (1995). Toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants using freshwater invertebrates: A review of methods and applications. Environ. Toxicol. Chem. 14, 1885-1894.

(23) Kukkonen, J. & Landrum, P.F. (1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to *Lumbriculus variegatus* (Oligochaeta). Environ. Toxicol. Chem. 13, 1457-1468.

(24) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. (1998a). Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of *Lumbriculus variegatus* (Müller): Implications for sediment toxicity testing. Environ. Toxicol. Chem. 17: 2196-2202.

(25) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. (1998b). Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete *Lumbriculus variegatus* (Müller). Hydrobiologia 377: 183-194.

(26) Landrum, P.F., Gedeon, M.L., Burton, G.A., Greenberg. M.S., & Rowland, C.D. (2002). Biological Responses of *Lumbriculus variegatus* Exposed to Fluoranthene-Spiked Sediment. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 42 1556--1557.

(27) Brunson, E.L., Canfield, T.J., Ingersoll, C.J. & Kemble, N.E. (1998). Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the Upper Mississippi river using field-collected oligochaetes and laboratory-exposed *Lumbriculus variegatus*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 35191-201

(28) Ingersoll, C.G., Brunson, E.L., Wang N., Dwyer, F.J., Ankley, G.T., Mount D.R., Huckins J., Petty. J. & Landrum, P. F. (2003). Uptake and depuration of non-ionic organic contaminants from sediment by the oligochaete, *Lumbriculus variegatus*. Environmental Toxicology and Chemistry 22, 872-885.

(29) Rodriguez, P. & Reynoldson, T.B. (1999). Laboratory methods and criteria for sediment bioassessment. In: A. Mudroch, J.M. Azcue & P. Mudroch (eds.): Manual of Bioassessment of aquatic sediment quality. Lewis Publishers, Boca Raton, CRC Press LLC.

(30) Liebig, M., Egeler, Ph. Oehlmann, J., & Knacker, Th. (2005). Bioaccumulation of ^{14}C-17α-ethinylestradiol by the oligochaete *Lumbriculus variegatus* in artificial sediment. Chemosphere 59, 271-280.

(31) Brust, K., O. Licht, V. Hultsch, D. Jungmann & R. Nagel (2001). Effects of Terbutryn on Aufwuchs and *Lumbriculus variegatus* in Artificial Indoor Streams. Environ. Toxicol. Chemistry, Vol. 20, pp. 2000–2007.

(32) Oetken, M., K.-U. Ludwichowski & R. Nagel (2000). Sediment tests with *Lumbriculus variegatus* and *Chironomus riparius* and 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) within the scope of EG-AltstoffV. By order of the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), FKZ 360 12 001, March 2000.

▼**M6**

(33) Leppänen M.T. & Kukkonen J.V.K. (1998). Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (*Lumbriculus variegatus*, Müller). Environ. Sci. Toxicol. 321503-1508

(34) Dermott R. & Munawar M. (1992). A simple and sensitive assay for evaluation of sediment toxicity using *Lumbriculus variegatus* (Müller). Hydrobiologia 235/236: 407-414.

(35) Drewes C.D. & Fourtner C.R. (1990). Morphallaxis in an aquatic oligochaete, *Lumbriculus variegatus*: Reorganisation of escape reflexes in regenerating body fragments. Develop. Biol. 138: 94-103.

(36) Brinkhurst, R.O. (1971). A guide for the identification of British aquatic oligochaeta. Freshw. Biol. Assoc., Sci. Publ. No. 22.

(37) Capítulo C.1 do presente anexo (Ensaio de toxicidade aguda para os peixes).

(38) OCDE (1992c). Guidelines for Testing of Chemicals No. 210. Fish, Early-life Stage Toxicity Test. OCDE, Paris.

(39) Egeler, Ph., Römbke, J., Meller, M., Knacker, Th., Franke, C., Studinger, G. & Nagel, R. (1997). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by tubificid sludgeworms (Oligochaeta) under standardised laboratory conditions. Chemosphere 35, 835-852.

(40) Meller, M., P. Egeler, J. Roembke, H. Schallnass, R. Nagel & B. Streit. (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulphate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media. Ecotox. and Environ. Safety, 39, 10-20.

(41) Egeler, Ph., Römbke, J., Knacker, Th., Franke, C. & Studinger, G. (1999). Workshop on «Bioaccumulation: Sediment test using benthic oligochaetes», 26.-27.04.1999, Hochheim/Main, Germany. Report on the R+D-project No. 298 67 419, Umweltbundesamt, Berlin.

(42) Suedel, B.C. & Rodgers, J.H. (1993). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13, 1163-1175.

(43) Naylor, C. & C. Rodrigues. (1995). Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291-3303.

(44) Kaster, J.L., Klump, J.V., Meyer, J., Krezoski, J. & Smith, M.E. (1984). Comparison of defecation rates of *Limnodrilus hoffmeisteri* using two different methods. Hydrobiologia 11, 181-184.

(45) Martinez-Madrid, M., Rodriguez, P., Perez-Iglesias, J.I. & Navarro, E. (1999). Sediment toxicity bioassays for assessment of contaminated sites in the Nervion river (Northern Spain). 2. *Tubifex tubifex* (Müller) reproduction sediment bioassay. Ecotoxicology 8, 111-124.

(46) Environment Canada (1995). Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. Environmental Protection Series Report EPS 1/RM/30.

(47) Landrum, P.F. (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi*. Environ. Sci. Technol. 23588-595

(48) Brooke, L.T., Ankley, G.T., Call, D.J. & Cook, P.M. (1996). Gut content and clearance for three species of freshwater invertebrates. Environ. Toxicol. Chem. 15, 223-228.

(49) Mount, D.R., Dawson, T.D. & Burkhard, L.P. (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus variegatus*. Environ. Toxicol. Chem. 18, 1244-1249.

▼**M6**

(50) OCDE (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application. OECD Series on Testing and Assessment No. 54, OECD, Paris, France.

(51) Liebig M., Meller M. & Egeler P. (2004). Sedimenttoxizitätstests mit aquatischen Oligochaeten — Einfluss verschiedener Futterquellen im künstlichen Sediment auf Reproduktion und Biomasse von *Lumbriculus variegatus*. Proceedings 5/2004: Statusseminar Sedimentkontakttests. March 24-25, 2004. BfG (Bundesanstalt für Gewässerkunde), Koblenz, Germany. pp. 107-119.

Bibliografia suplementar sobre métodos estatísticos:

Dunnett, C.W. (1955). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. Amer. Statist. Ass. J. 50, 1096-1121.

Dunnett, C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20, 482-491.

Finney, D.J. (1971). Probit Analysis (3rd ed.), pp. 19-76. Cambridge Univ. Press.

Finney, D.J. (1978). Statistical Method in Biological Assay. Charles Griffin & Company Ltd, London.

Hamilton, M.A., R.C. Russo & R.V. Thurston. (1977). Trimmed Spearman-Karber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ. Sci. Technol. 11 7 16 714 -719 Correction: Environ. Sci. Technol. 121998417

Holm, S. (1979). A simple sequentially rejective multiple test procedure. Scand. J. Statist. 665-70

Sokal, R.R. & F.J. Rohlf. (1981) Biometry. The principles and practice of statistics in biological research. 2nd edition. W.H. Freeman & Company. New York.

Miller, R.G., Jr. (1986). Beyond ANOVA, basics of applied statistics. John Wiley & Sons. New York.

Shapiro S.S. & Wilk M.B (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). Biometrika 52: 591-611.

Williams, D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, 103-117.

Williams, D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, 519 531.

▼M6

Apêndice 1

Definições

No âmbito do presente método de ensaio, aplicam-se as seguintes definições:

Produto químico: uma substância ou mistura.

Período de acondicionamento: período utilizado para estabilizar a componente microbiana do sedimento e eliminar, por exemplo, o amoníaco proveniente dos componentes deste; tem lugar antes do enriquecimento do sedimento com o produto químico em estudo. Geralmente, a água sobrenadante é eliminada após o condicionamento.

EC_x: concentração do produto químico em estudo no sedimento que resulta num efeito de x % (por exemplo: 50 %) num parâmetro biológico, num determinado período de exposição.

Período de equilibração: período utilizado para permitir a distribuição do produto químico em estudo entre a fase sólida, a água dos poros e a água sobrenadante; tem lugar após o enriquecimento dos sedimentos com o produto químico em estudo e antes da introdução dos organismos de ensaio.

Fase de exposição: período durante o qual os organismos de ensaio são expostos ao produto químico em estudo.

Sedimentos formulados (também conhecidos por reconstituídos, artificiais ou sintéticos): mistura de matérias utilizadas para simular os componentes físicos de sedimentos naturais.

Menor concentração com efeitos observáveis (LOEC): menor concentração de ensaio do produto químico em estudo para a qual se observa um efeito significativo (a $p \leq 0,05$), comparativamente com o controlo. No entanto, todas as concentrações de ensaio superiores à LOEC devem ter um efeito igual ou superior ao verificado com a LOEC. Se estas duas condições não puderem ser satisfeitas, deve fornecer-se uma explicação pormenorizada sobre a forma como se determinou a LOEC (e, consequentemente, a NOEC).

Concentração sem efeitos observáveis (NOEC): a mais elevada concentração ensaiada que, quando comparada com o controlo, não tem qualquer efeito estatisticamente significativo ($p \leq 0,05$), durante um determinado período de exposição.

Coeficiente de partição octanol/água (K_{ow}; também representado por P_{ow}): quociente entre a solubilidade de um produto químico em *n*-octanol e em água, em condições de equilíbrio, representando a lipofilia desse produto químico (capítulo A.24 do presente anexo). O valor K_{ow} ou o logaritmo de K_{ow} (log K_{ow}) é utilizado como indicador do potencial de bioacumulação de um produto químico em organismos aquáticos.

Coeficiente de partição carbono orgânico-água (K_{oc}): quociente entre a concentração de um produto químico no interior ou à superfície da fração de carbono orgânico de um sedimento e a concentração do mesmo produto químico na água, em condições de equilíbrio.

Água sobrenadante: água que cobre o sedimento, no recipiente de ensaio.

Água intersticial ou água dos poros: água que ocupa o espaço entre as partículas do sedimento ou do solo.

Sedimento enriquecido: sedimento ao qual foi adicionado o produto químico em estudo.

Produto químico em estudo: qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado o presente método de ensaio.

▼**M6**

Apêndice 2

Composição da água reconstituída recomendada

[adoção a partir do capítulo C.1 do presente anexo (1)]

a) *Solução de cloreto de cálcio*

Dissolver 11,76 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ em água desionizada; completar o volume até 1 litro com água desionizada.

b) *Solução de sulfato de magnésio*

Dissolver 4,93 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ em água desionizada; completar o volume até 1 litro com água desionizada.

c) *Solução de bicarbonato de sódio*

Dissolver 2,59 g de $NaHCO_3$ em água desionizada; completar o volume até 1 litro com água desionizada.

d) *Solução de cloreto de potássio*

Dissolver 0,23 g de KCl em água desionizada; completar o volume até 1 litro com água desionizada.

Os produtos químicos devem ser todos de qualidade analítica.

A condutividade da água destilada ou desionizada não deve exceder 10 μScm^{-1}.

Misturam-se 25 ml de cada uma das soluções a) a d), sendo o volume total completado até 1 litro com água desionizada. A soma das concentrações de iões cálcio e magnésio destas soluções é de 2,5 mmol/l.

A proporção iónica Ca:Mg é de 4:1 e a proporção iónica Na:K é de 10:1. A capacidade de acidificação, $K_{S4.3}$, desta solução é de 0,8 mmol/l.

Arejar a água de diluição até à saturação com oxigénio e armazená-la durante cerca de dois dias, sem mais arejamento, antes da utilização.

REFERÊNCIA

(1) Capítulo C.1 do presente anexo (Ensaio de toxicidade aguda para os peixes).

▼**M6**

Apêndice 3

Características fisico-químicas de uma água de diluição adequada

Componente	Concentrações
Partículas	< 20 mg/l
Carbono orgânico total	< 2 µg/l
Amoníaco não ionizado	< 1 µg/l
Cloro residual	< 10 µg/l
Pesticidas organofosforados totais	< 50 ng/l
Soma dos pesticidas organoclorados e dos bifenilos policlorados totais	< 50 ng/l
Cloro orgânico total	< 25 ng/l
(adaptação a partir de OCDE (1992) (1))	

REFERÊNCIA

(1) OCDE (1992). Guidelines for Testing of Chemicals No. 210. Fish, Early-life Stage Toxicity Test. OCDE, Paris.

▼M6

Apêndice 4

Sedimentos artificiais recomendados — orientações para a preparação e a armazenagem

Componentes dos sedimentos

Componente	Características	% do sedimento peso seco
Turfa	Turfa de esfagno, grau de decomposição: «médio», seca ao ar, sem resíduos vegetais visíveis, finamente moída (granulometria ≤ 0,5 mm)	5 ± 0.5
Areia de quartzo	Granulometria: ≤ 2 mm, mas > 50 % das partículas de granulometria na gama 50-200 µm	75 - 76
Argila caulínica	Teor de caulinite ≥ 30 %	20 ± 1
Fonte de alimentação	Por exemplo, ortiga pulverizada (Folia urticae), folhas de Urtica dioica finamente trituradas (partículas ≤ 0,5 mm); para consumo humano, conforme com as normas farmacêuticas; em adição ao sedimento seco	0,4 - 0,5 %
Carbono orgânico	Ajustado por adição de turfa e areia	2 ± 0,5
Carbonato de cálcio	$CaCO_3$ pulverizado, quimicamente puro, em adição ao sedimento seco	0,05 - 1
Água desionizada	Condutividade ≤ 10 µS/cm, em adição ao sedimento seco	30 - 50

Nota: Caso se prevejam concentrações elevadas de amoníaco (por exemplo, se o produto químico em estudo for um inibidor de nitrificação conhecido), pode ser útil substituir 50 % do pó de urticáceas, rico em azoto, por α-celulose em pó, quimicamente pura, com granulometria ≤ 0,5 mm; (1) (2).

Preparação

A turfa é seca ao ar e moída até se obter um pó fino. Prepara-se uma suspensão da quantidade necessária de turfa pulverizada em água desionizada, por recurso a um dispositivo de homogeneização de alta eficiência. O pH desta suspensão é ajustado para 5,5 ± 0,5 com $CaCO_3$. A suspensão é acondicionada durante, pelo menos, dois dias, com agitação ligeira a 20 ± 2 °C, para estabilizar o pH e estabelecer um perfil microbiano estável. Findo este período, determina-se novamente o pH, que deve ser de 6,0 ± 0,5. A suspensão de turfa é então misturada com os outros componentes (areia e argila caulínica) e água desionizada, de forma a obter sedimentos homogéneos com teor de água na ordem de 30 %–50 % da massa seca dos sedimentos. O pH da mistura final é determinado uma vez mais e, se necessário, ajustado para 6,5-7,5 com $CaCO_3$. No entanto, se for de prever a libertação de amoníaco, pode ser útil manter o pH do sedimento a um valor inferior a 7,0 (por exemplo, entre 6,0 e 6,5). Colhem-se amostras do sedimento para determinar o peso seco e o teor de carbono orgânico. Se for de prever a libertação de amoníaco, o sedimento formulado pode ser acondicionado durante sete dias em condições semelhantes às do ensaio subsequente (por exemplo, 1:4 para o rácio sedimentos-água; altura da camada de sedimento tal como nos recipientes de ensaio) antes do enriquecimento com o produto químico em

▼M6

estudo, ou seja, deve ser complementado com água que, por sua vez, deve ser arejada. No final do período de acondicionamento, remove-se e rejeita-se a água sobrenadante. Posteriormente, a areia de quartzo enriquecida é misturada com o sedimento para cada concentração de produto, sendo o sedimento distribuído pelos recipientes dos replicados e coberto com a água de ensaio. Os recipientes são, em seguida, incubados em condições idênticas às do ensaio subsequente. Inicia-se aqui o período de equilibração. A água sobrenadante deve ser arejada.

O alimento escolhido deve ser adicionado antes ou durante o enriquecimento do sedimento com o produto químico em estudo. Pode começar por ser misturado com a suspensão de turfa (ver *supra*). É possível, contudo, evitar uma degradação excessiva da fonte alimentar antes da introdução dos organismos de ensaio (por exemplo, em caso de um longo período de equilíbrio), reduzindo ao mínimo possível o período entre o fornecimento do alimento e o início da exposição. Para assegurar que o alimento é impregnado com o produto químico em estudo, a fonte alimentar deve ser misturada com o sedimento, o mais tardar no dia em que o produto químico em estudo é aplicado no sedimento.

Armazenamento

Os componentes secos dos sedimentos artificiais podem ser armazenados num local seco e fresco ou à temperatura ambiente. Os sedimentos impregnados com o produto químico em estudo devem ser imediatamente utilizados no ensaio. Podem então ser armazenadas amostras de sedimento enriquecido, respeitando as condições recomendadas para o produto químico em estudo, até à realização das análises.

REFERÊNCIAS

(1) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. In co-operation with R. Nagel & B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 20267429

(2) Liebig M., Meller M. & Egeler P. (2004). Sedimenttoxizitätstests mit aquatischen Oligochaeten — Einfluss verschiedener Futterquellen im künstlichen Sediment auf Reproduktion und Biomasse von *Lumbriculus variegatus*. Proceedings 5/2004: Statusseminar Sedimentkontakttests. March 24-25, 2004. BfG (Bundesanstalt für Gewässerkunde), Koblenz, Germany. pp. 107-119.

▼M6

Apêndice 5

Métodos de cultura de *Lumbriculus variegatus*

A espécie *Lumbriculus variegatus* (MÜLLER), oligoqueta da família *Lumbriculidae*, coloniza os sedimentos de água doce e é amplamente utilizada em ensaios ecotoxicológicos. Pode ser facilmente cultivada em condições laboratoriais. Descrevem-se em seguida os métodos de cultura.

Métodos de cultura

As condições de cultura de *Lumbriculus variegatus* são descritas em pormenor em Phipps *et al*. (1993) (1), Brunson *et al*. (1998) (2), ASTM (2000) (3) e U.S. EPA (2000) (4). Apresenta-se em seguida uma breve síntese dessas condições. Uma das grandes vantagens da espécie *L. variegatus* reside na sua reprodução rápida, que resulta num rápido aumento da biomassa das populações cultivadas em laboratório [por exemplo, (1) (3) (4) (5)].

Os vermes podem ser cultivados em aquários de grandes dimensões (57-80 l) a 23 °C, com um fotoperíodo de 16 dias de luz para 8 de obscuridade (100-1 000 lx) e renovação diária da água natural (45-50 l por aquário). O substrato é preparado mediante o corte, em tiras, de toalhas de papel pardo, seguidamente embebidas em água de cultura durante alguns segundos, de forma a obter pequenos fragmentos de substrato de papel. O substrato pode ser diretamente utilizado no aquário de cultura de *Lumbriculus* como cobertura do fundo do reservatório, ou armazenado congelado em água desionizada, para utilização posterior. Os novos substratos colocados no reservatório duram, em geral, cerca de dois meses.

As culturas de vermes iniciam-se com 500-1 000 animais, alimentados três vezes por semana com uma suspensão de 10 ml que contém 6 g de alimento para trutas, aquando da renovação ou em condições dinâmicas. As culturas estáticas ou semiestáticas devem ser alvo de taxas de alimentação mais baixas, para evitar a proliferação de bactérias e fungos.

Nestas condições, o número de indivíduos na cultura duplica, em geral, cada 10 a 14 dias.

A espécie *Lumbriculus variegatus* pode também ser cultivada, alternativamente, num sistema constituído por uma camada de areia de quartzo — como no caso dos sedimentos artificiais (1-2 cm de profundidade) — e água reconstituída. Como recipientes de cultura, podem utilizar-se recipientes de aço inoxidável ou de vidro com uma altura de 12 a 20 cm. O corpo de água deve ser ligeiramente arejado (por exemplo, 2 bolhas por segundo) por recurso a uma pipeta de Pasteur, posicionada cerca de 2 cm acima da superfície do sedimento. Para evitar, por exemplo, a acumulação de amoníaco, a água sobrenadante deve ser renovada por recurso a um sistema de fluxo ou (pelo menos uma vez por semana) manualmente. Os oligoquetas são conservados à temperatura ambiente, com 16 horas de exposição à luz (100-1 000 lx) e 8 horas de obscuridade. Na cultura semiestática (renovação da água uma vez por semana), os vermes são alimentados com TetraMin duas vezes por semana (por exemplo, 0,6-0,8 mg/cm^2 de superfície de sedimento), podendo aplicar-se como suspensão de 50 mg de TetraMin por ml de água desionizada.

Para transferir os espécimes de *Lumbriculus variegatus* das culturas, remover substrato com uma malha fina ou remover os organismos com uma pipeta de vidro larga moldada a quente (5 mm de diâmetro, aproximadamente) para um copo. Se também passar substrato para o copo, este, com os animais e o substrato, é deixado de um dia para o outro em condições dinâmicas, o que permite eliminar o substrato, enquanto os vermes permanecem no fundo do copo. Os animais podem, então, ser introduzidos em tanques de cultura recém-preparados ou ser alvo de uma preparação complementar para o ensaio, como referido em (3) (4), ou do modo seguinte:

Ao utilizar a espécie *L. variegatus* em ensaios com sedimentos, o seu modo de reprodução [arquitomia ou morfalaxe — ver, por exemplo, (6)] constitui um aspeto crítico. A reprodução assexuada resulta em dois fragmentos, que não se alimentam durante um certo período até a cabeça ou a cauda estarem regeneradas [ver, por exemplo, (7) (8)]. Isto significa que, no caso da *L. variegatus*, a exposição por ingestão de sedimentos contaminados não ocorre de modo contínuo.

▼M6

Por conseguinte, importa proceder a uma sincronização para minimizar reprodução e regeneração descontroladas e a consequente variação dos resultados do ensaio. Esta variação pode ocorrer quando alguns indivíduos, por terem sofrido fragmentação e, consequentemente, não se terem alimentado durante um dado período, estão menos expostos ao produto químico em estudo do que outros indivíduos que não sofreram fragmentação durante o ensaio [(9) (10) (11)]. Entre 10 e 14 dias antes do início da exposição, os vermes devem ser fragmentados artificialmente (sincronização). Devem selecionar-se para sincronização espécimes de grandes dimensões (adultos), de preferência que não mostrem sinais de morfalaxe recente. Colocam-se os vermes sobre uma lâmina de vidro com uma gota de água de cultura, seccionando-os em seguida com um bisturi na região mediana do corpo. As extremidades posteriores devem ser de dimensão semelhante. Deixa-se que as extremidades posteriores regenerem novas cabeças, num recipiente com o mesmo substrato utilizado na cultura e com água reconstituída, até ao início da exposição. A regeneração de novas cabeças é indicada pelo facto de os vermes sincronizados se enterrarem no substrato (a presença de cabeças regeneradas pode ser confirmada pela inspeção de uma subamostra representativa com um microscópio binocular). Considera-se então que os organismos de ensaio se encontram em estado fisiológico idêntico. Isto significa que, quando ocorre reprodução por morfalaxe de vermes sincronizados durante o ensaio, praticamente todos os animais sofrem uma exposição idêntica ao sedimento enriquecido. A alimentação dos vermes sincronizados deve ter lugar logo que os mesmos comecem a enterrar-se no substrato ou no sétimo dia após o seccionamento. O regime alimentar deve ser idêntico ao das culturas regulares, embora possa afigurar-se aconselhável fornecer aos vermes sincronizados os mesmos alimentos que no ensaio. Os animais devem ser mantidos à temperatura de ensaio, ou seja, 20 ± 2 °C. Após a regeneração, devem utilizar-se para o ensaio animais completos e intactos, que nadem ou rastejem ativamente após um ligeiro estímulo mecânico. Devem evitar-se lesões ou autotomia dos vermes: por exemplo, utilizando pipetas polidas a quente ou palitos dentários de aço inoxidável, para a sua manipulação.

Fontes de culturas de arranque de *Lumbriculus variegatus* (endereços nos EUA adaptados a partir de (4))

Europa

ECT Oekotoxikologie GmbH
Böttgerstr. 2-14
D-65439 Flörsheim/Main
Alemanha

Bayer Crop Science AG
Development — Ecotoxicology
Alfred-Nobel-Str. 50
D-40789 Monheim
Alemanha

University of Joensuu
Laboratory of Aquatic Toxicology
Dept. of Biology
Yliopistokatu 7, P.O. Box 111
FIN-80101 Joensuu
Finlândia

Dresden University of Technology
Institut für Hydrobiologie
Fakultät für Forst-, Geo- und Hydrowissenschaften
Mommsenstr. 13
D-01062 Dresden
Alemanha

C.N.R.- I.R.S.A.
Italian National Research Council
Water Research Institute
Via Mornera 25
I-20047 Brugherio MI

EUA

U.S. Environmental Protection Agency
Mid-Continent Ecological Division
6201 Congdon Boulevard
Duluth, MN 55804

Michigan State University
Department of Fisheries and Wildlife
No. 13 Natural Resources Building
East Lansing, MI 48824-1222

▼**M6**

U.S. Environmental Protection Agency
Environmental Monitoring System Laboratory
26 W. Martin Luther Dr.
Cincinnati, OH 45244

Wright State University
Institute for Environmental Quality
Dayton, OH 45435

Columbia Environmental Research Center
U.S. Geological Survey
4200 New Haven Road
Columbia, MO 65201

Great Lakes Environmental Research Laboratory, NOAA
2205 Commonwealth Boulevard
Ann Arbor, MI 48105-1593

REFERÊNCIAS

(1) Phipps, G.L., Ankley, G.T., Benoit, D.A. & Mattson, V.R. (1993). Use of the aquatic Oligochaete *Lumbriculus variegatus* for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. Environ.Toxicol. Chem. 12, 269-279.

(2) Brunson, E.L., Canfield, T.J., Ingersoll, C.J. & Kemble, N.E. (1998). Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the Upper Mississippi river using field-collected oligochaetes and laboratory-exposed Lumbriculus variegatus. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 35191-201

(3) ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(4) U.S. EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.

(5) Kukkonen, J. & Landrum, P.F. (1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to Lumbriculus variegatus (Oligochaeta). Environ. Toxicol. Chem. 13, 1457-1468.

(6) Drewes C.D. & Fourtner C.R. (1990). Morphallaxis in an aquatic oligochaete, Lumbriculus variegatus: Reorganisation of escape reflexes in regenerating body fragments. Develop. Biol. 138: 94-103.

(7) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. (1998a). Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of Lumbriculus variegatus (Müller): Implications for sediment toxicity testing. Environ. Toxicol. Chem. 17: 2196-2202.

(8) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. (1998b). Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete Lumbriculus variegatus (Müller). Hydrobiologia 377: 183-194.

(9) Brust, K., O. Licht, V. Hultsch, D. Jungmann & R. Nagel (2001). Effects of Terbutryn on Aufwuchs and Lumbriculus variegatus in Artificial Indoor Streams. Environ. Toxicol. Chemistry, Vol. 20, pp. 2000–2007.

(10) Oetken, M., K.-U. Ludwichowski & R. Nagel (2000). Sediment tests with Lumbriculus variegatus and Chironomus riparius and 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) within the scope of EG-AltstoffV. By order of the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), FKZ 360 12 001, March 2000.

(11) Leppänen M.T. & Kukkonen J.V.K. (1998). Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (Lumbriculus variegatus, Müller). Environ. Sci. Toxicol. 32, 1503-1508.

▼M6

Apêndice 6

Resumo dos resultados dos estudos interlaboratoriais comparativos

Ensaio de toxicidade nos sedimentos com *Lumbriculus variegatus*

Quadro 1

Resultados dos estudos interlaboratoriais comparativos: Número médio de vermes nos controlos e nos controlos com solvente, no final do ensaio; SD = desvio-padrão; CV = coeficiente de variação.

	Número médio de vermes nos controlos	SD	CV (%)	n	Número médio de vermes nos controlos com solvente	SD	CV (%)	n
	32,3	7,37	22,80	3	**39,0**	3,61	9,25	3
	40,8	6,55	16,05	6	**36,0**	5,29	14,70	3
	41,5	3,54	8,52	2	**38,5**	7,05	18,31	4
	16,3	5,99	36,67	6	**30,8**	6,70	21,80	4
	24,3	10,69	43,94	3	**26,3**	3,06	11,60	3
	28,5	8,29	29,08	4	**30,7**	1,15	3,77	3
	28,3	3,72	13,14	6	**28,8**	2,56	8,89	6
	25,3	5,51	21,74	3	**27,7**	1,53	5,52	3
	23,8	2,99	12,57	4	**21,3**	1,71	8,04	4
	36,8	8,80	23,88	6	**35,0**	4,20	11,99	6
	33,0	3,58	10,84	6	**33,5**	1,73	5,17	4
	20,7	2,73	13,22	6	**15,0**	6,68	44,56	4
	42,0	7,07	16,84	6	**43,7**	0,58	1,32	3
	18,2	3,60	19,82	6	**21,7**	4,04	18,65	3
	32,0	3,95	12,34	6	**31,3**	4,79	15,32	4
Média interlaboratorial	**29,59**		**20,10**		**30,61**		**13,26**	
SD	**8,32**		**10,03**		**7,57**		**10,48**	
n	**15**				**15**			
mín.	**16,3**				**15,0**			
máx.	**42,0**				**43,7**			
CV (%)	**28,1**				**24,7**			

▼M6

Quadro 2

Resultados dos estudos interlaboratoriais comparativos: Média do peso seco dos vermes por replicado nos controlos e nos controlos com solvente, no final do ensaio; SD = desvio-padrão; CV = coeficiente de variação.

	Peso seco total de vermes por replicado (controlos)	SD	CV (%)	n	Peso seco total de vermes por replicado (controlos com solvente)	SD	CV (%)	n
	24,72	6,31	25,51	3	27,35	4,08	14,93	3
	30,17	2,04	6,75	6	33,83	10,40	30,73	3
	23,65	3,61	15,25	2	28,78	4,68	16,28	4
	12,92	6,83	52,91	6	24,90	6,84	27,47	4
	21,31	4,17	19,57	3	25,87	5,30	20,49	3
	22,99	4,86	21,16	4	24,64	5,09	20,67	3
	18,91	1,91	10,09	6	19,89	1,77	8,89	6
	24,13	1,63	6,75	3	25,83	2,17	8,41	3
	22,15	3,18	14,34	4	22,80	2,60	11,40	4
	35,20	8,12	23,07	6	31,42	8,45	26,90	6
	41,28	5,79	14,02	6	41,42	4,37	10,55	4
	15,17	5,78	38,09	6	10,50	3,42	32,53	4
	35,69	8,55	23,94	6	38,22	1,23	3,21	3
	19,57	5,21	26,65	6	28,58	6,23	21,81	3
	29,40	2,16	7,34	6	31,15	2,70	8,67	4
Média interlaboratorial	**25,15**		**20,36**		**27,68**		**17,53**	
SD	**7,87**		**12,56**		**7,41**		**9,10**	
n	**15**				**15**			
mín.	**12,9**				**10,5**			
máx.	**41,3**				**41,4**			
CV (%)	**31,3**				**26,8**			

▼**M6**

Quadro 3

Toxicidade do PCP: Resumo dos pontos finais do estudo interlaboratorial comparativo; médias interlaboratoriais de EC_{50}, NOEC e LOEC SD = desvio-padrão; CV = coeficiente de variação.

Parâmetro biológico		Média inter-labora-torial (mg/kg)	mín.	máx.	Fator inter-labo-ratorial	SD	CV (%)	Média geomé-trica (mg/kg)
Número total de vermes	**EC_{50}**	**23,0**	4,0	37,9	9,4	10,7	46,3	19,9
	NOEC	**9,9**	2,1	22,7	10,7	7,2	72,3	7,6
	LOEC	**27,9**	4,7	66,7	14,2	19,4	69,4	20,9
	MDD (%)	**22,5**	7,1	39,1				
Peso seco total de vermes	**EC_{50}**	**20,4**	7,3	39,9	5,5	9,1	44,5	18,2
	NOEC	**9,3**	2,1	20,0	9,4	6,6	70,4	7,4
	LOEC	**25,7**	2,1	50,0	23,5	16,8	65,5	19,4
	MDD (%)	**24,8**	10,9	44,7				
Mortalidade/ /sobrevivência	**LC_{50}**	**25,3**	6,5	37,2	5,7	9,4	37,4	23,1
	NOEC	**16,5**	2,1	40,0	18,8	10,3	62,4	12,8
	LOEC	**39,1**	4,7	66,7	14,2	18,1	46,2	32,6
Reprodução (aumento do número de vermes por replicado)	**EC_{50}**	**20,0**	6,7	28,9	4,3	7,6	37,9	18,3
	NOEC	**7,9**	2,1	20,0	9,4	5,2	66,0	6,4
	LOEC	**22,5**	2,1	50,0	23,5	15,4	68,6	16,0
	MDD (%)	**29,7**	13,9	47,9				
Crescimento (aumento de biomassa por replicado)	**EC_{50}**	**15,3**	5,7	29,9	5,2	7,1	46,5	13,7
	NOEC	**8,7**	2,1	20,0	9,4	6,0	68,1	6,9
	LOEC	**24,0**	2,1	50,0	23,5	15,7	65,5	17,3
	MDD (%)	**32,2**	13,6	65,2				

MDD: Diferença mínima detetável entre os valores de controlo, durante os testes de hipóteses; parâmetro utilizado como medida do poder estatístico.

REFERÊNCIA

Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. In co-operation with R. Nagel & B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.

▼M6

C.36. ENSAIO DE REPRODUÇÃO NO SOLO DO ÁCARO PREDADOR *HYPOASPIS (GEOLAELAPS) ACULEIFER*

INTRODUÇÃO

1. Este método de ensaio é equivalente ao *Test Guideline* TG 226 (2008) da OCDE. Foi concebido para avaliar os efeitos na produção de descendência da espécie de ácaro *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* Canestrini (Acari: Laelapidae) em consequência da presença de produtos químicos no solo, desse modo permitindo estimar a inibição da taxa de crescimento específico da população (1,2). Neste contexto, «produção de descendência» indica o número de juvenis no final do período de ensaio. *H. aculeifer* representa um nível trófico adicional relativamente às espécies para as quais se dispõe já de métodos de ensaio. Para efeitos do presente método de ensaio, considera-se adequado um ensaio de reprodução sem discriminação e quantificação das diversas fases do ciclo reprodutor. No caso de produtos químicos com cenários de exposição diversos da exposição através do solo, podem justificar-se outras abordagens (3).

2. A espécie *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* é considerada representativa da fauna do solo, nomeadamente dos ácaros predadores. Com distribuição mundial (5), pode ser facilmente obtida e criada em laboratório. O apêndice 7 contém um resumo da biologia da *H. aculeifer*. Estão disponíveis informações de base sobre a ecologia deste ácaro e a sua utilização em ensaios ecotoxicológicos: (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12).

PRINCÍPIO DO ENSAIO

3. Expõem-se fêmeas adultas a uma gama de concentrações do produto químico em estudo misturado no solo. O ensaio inicia-se com 10 fêmeas adultas por recipiente de replicação. Não se introduzem machos, pois a experiência mostrou que, quando há machos presentes, as fêmeas acasalam imediatamente ou pouco tempo após a eclosão da fase de deuteroninfa. Além disso, a inclusão de machos prolongaria o ensaio por tal forma que tornaria necessária a discriminação de faixas etárias. Portanto, o acasalamento, em si, não faz parte do ensaio. As fêmeas são introduzidas 28 a 35 dias após o início do período de postura na sincronização (ver apêndice 4), dado considerar-se que foram já fecundadas e passaram a fase que precede a oviposição. A 20 °C, o ensaio termina no 14.º dia após a introdução de fêmeas (dia 0), o que permite que os primeiros descendentes controlados atinjam a fase de deuteroninfa (ver apêndice 4). Como principal variável mensurada, determina-se o número de juvenis por recipiente de ensaio e, adicionalmente, o número de fêmeas sobreviventes. A reprodução dos ácaros expostos ao produto químico em estudo é comparada com a dos controlos, a fim de determinar a EC_x (por exemplo EC_{10}, EC_{50}) ou a concentração sem efeitos observáveis (NOEC — ver definição no anexo 1), consoante a conceção experimental (ver ponto 29). O apêndice 8 apresenta uma panorâmica geral do programa de ensaio.

INFORMAÇÕES SOBRE O PRODUTO QUÍMICO EM ESTUDO

4. De preferência, devem conhecer-se a solubilidade em água, o log K_{ow}, o coeficiente de partição solo-água e a pressão de vapor do produto químico em estudo. É aconselhável dispor de informações adicionais sobre o destino do produto químico no solo, nomeadamente as taxas de degradação biótica e abiótica.

5. O presente método de ensaio pode ser utilizado com produtos químicos solúveis ou insolúveis em água. No entanto, o modo de aplicação do produto químico em estudo varia consoante o caso. O método não é aplicável a produtos químicos voláteis, ou seja, produtos cuja constante de Henry ou cujo coeficiente de partição ar/água forem superiores a 1, nem a produtos químicos cuja pressão de vapor exceda 0,0133 Pa a 25 °C.

▼M6

VALIDADE DO ENSAIO

6. Para que os resultados de um ensaio sejam considerados válidos, os controlos sem o produto químico em estudo devem satisfazer os seguintes critérios:

— A mortalidade média das fêmeas adultas não pode exceder 20 % no final do ensaio;

— O número médio de juvenis por replicado (com 10 fêmeas adultas introduzidas) deve ser, pelo menos, de 50 no final do ensaio;

— O coeficiente de variação calculado para o número de juvenis por replicado não pode ser superior a 30 % no final do ensaio definitivo.

PRODUTO QUÍMICO DE REFERÊNCIA

7. É necessário determinar a EC_x e/ou a NOEC de um produto químico de referência, para garantir que as condições de ensaio laboratoriais são adequadas e averiguar se a resposta dos organismos de ensaio não sofreu alterações ao longo do tempo. O dimetoato (n.º CAS 60-51-5) é um produto químico de referência adequado, por ter sido demonstrado que afeta a dimensão da população (4). O ácido bórico (n.º CAS 10043-35-3) pode ser utilizado como alternativa. Há, contudo, menos experiência com este produto químico. São possíveis duas opções:

— O produto químico de referência é ensaiado em paralelo com a determinação da toxicidade de cada produto químico em estudo a uma dada concentração, devendo ser previamente demonstrado num estudo dose-resposta que essa concentração provoca um efeito de redução da descendência > 50 %. Neste caso, o número de replicados deve ser o mesmo que nos controlos (ver ponto 29).

— Em alternativa, o produto químico de referência é ensaiado 1-2 vezes por ano num ensaio de dose-resposta. Consoante a conceção selecionada, o número de concentrações e replicados e o fator de espaçamento diferem (ver ponto 29), devendo, contudo, alcançar-se uma resposta de 10-90 % de efeito (fator de espaçamento: 1,8). A EC_{50} para o dimetoato, com base no número de juvenis, deve situar-se na gama de 3,0 a 7,0 mg s.a./kg de solo (peso seco). A partir dos resultados já obtidos com o ácido bórico, a EC_{50}, com base no número de juvenis, deve situar-se na gama de 100 a 500 mg/kg de solo (peso seco).

DESCRIÇÃO DO ENSAIO

Recipientes e equipamentos

8. Devem utilizar-se recipientes de ensaio de 3-5 cm de diâmetro (altura do solo ≥ 1,5 cm), de vidro ou de outro material quimicamente inerte, com tampa hermética. São preferíveis as tampas de rosca, caso em que os recipientes podem ser arejados duas vezes por semana. Em alternativa, podem utilizar-se coberturas que permitam a troca de gases entre o substrato e a atmosfera (por exemplo, gaze). Dado que o teor de humidade deve ser mantido a um nível suficientemente elevado durante o ensaio, é essencial controlar o peso de cada recipiente durante o ensaio e, se necessário, acrescentar água. Isto pode ser especialmente importante quando não se dispuser de tampas de rosca. Se se utilizar um recipiente de ensaio não transparente, a tampa deve ser de um material que permita o acesso da luz (por exemplo, cobertura transparente perfurada), evitando, em simultâneo, a fuga de ácaros. A dimensão e o tipo de recipiente de ensaio dependem do método de extração (ver apêndice 5 para mais pormenores). Se se aplicar extração de calor diretamente ao recipiente de ensaio, pode colocar-se no fundo um crivo de malha adequada (selado até à extração), devendo a profundidade do solo ser suficiente para permitir gradientes de temperatura e de humidade.

▼M6

9. É necessário material laboratorial de uso corrente, nomeadamente o seguinte:

— de preferência, recipientes de vidro com tampas de rosca;

— estufa;

— microscópio estereoscópico;

— escovas para a transferência dos ácaros;

— medidor de pH e de luz;

— balanças de precisão adequadas;

— equipamentos adequados para o controlo da temperatura;

— equipamentos adequados ao controlo da humidade atmosférica (não essencial se os recipientes de exposição estiverem cobertos com tampas);

— incubadora ou pequena câmara, com controlo de temperatura;

— equipamento de extração (ver apêndice 5) (13)

— painel superior de controlo da luz;

— boiões para a recolha dos ácaros extraídos.

Preparação do solo artificial

10. Este ensaio utiliza um solo artificial. O solo artificial é constituído pelos seguintes elementos (todos os valores são baseados em massa seca):

— 5 % de turfa de esfagno, seca ao ar e finamente moída (é aceitável uma granulometria de 2 ± 1 mm);

— 20 % de argila caulínica, de preferência com teor de caulinite superior a 30 %;

— cerca de 74 % de areia industrial seca ao ar (em função da quantidade de $CaCO_3$ necessária), com predominância de areia fina com mais de 50 % de partículas de granulometria compreendida entre 50 e 200 μm. A quantidade exata de areia depende da quantidade de $CaCO_3$ (ver abaixo), devendo, no seu conjunto, totalizar 75 %.

— < 1,0 % de carbonato de cálcio ($CaCO_3$) pulverizado, de qualidade analítica, a fim de obter um pH de 6,0 ± 0,5; a quantidade de carbonato de cálcio a utilizar pode depender principalmente da qualidade ou da natureza da turfa (ver nota 1);

Nota 1: A quantidade necessária de $CaCO_3$ depende dos componentes do substrato edáfico e deve ser determinada através de medições do pH de subamostras de solo imediatamente antes do ensaio (14).

Nota 2: O teor de turfa do solo artificial difere de outros métodos de ensaio com organismos do solo, na maioria dos quais se utiliza 10 % de turfa [por exemplo (15)]. No entanto, em conformidade com a referência (16), um solo agrícola típico não tem mais de 5 % de matéria orgânica, pelo que a redução do teor de turfa reflete a redução da capacidade de sorção do produto químico a carbono orgânico num solo natural.

Nota 3: Se necessário, designadamente para certas finalidades, podem utilizar-se como substrato de ensaio e/ou de cultura solos naturais de locais não poluídos. No entanto, se se utilizar solo natural, devem conhecer-se, no mínimo, a origem (local de recolha), o pH, a textura (granulometria) e o teor de matéria orgânica. Devem referir-se, se disponíveis, o tipo e a designação do solo de acordo com as normas de classificação. Os solos devem

▼M6

estar isentos de qualquer contaminação. Se o produto químico em estudo for um metal ou um composto organometálico, deve também determinar-se a capacidade de troca catiónica do solo natural. Deve dar-se especial atenção ao cumprimento dos critérios de validade, dado que, em geral, raramente se dispõe de informações de base sobre os solos naturais.

11. Misturam-se cuidadosamente (por exemplo, num misturador laboratorial de grandes dimensões) os componentes secos do solo. Para determinar o pH, utiliza-se uma mistura de solo com uma solução de cloreto de potássio (KCl) 1 M ou de cloreto de cálcio ($CaCl_2$) 0,01 M, numa proporção de 1:5 (ver ponto 14 e apêndice 3). Se a acidez do solo exceder a gama necessária (ver ponto 10), pode ser ajustada por adição de uma quantidade adequada de $CaCO_3$. Se o solo for demasiado alcalino, o pH pode ser corrigido mediante a adição de uma porção da mistura dos três primeiros componentes referidos no ponto 10, excluindo o $CaCO_3$.

12. A capacidade máxima do solo artificial para reter água é determinada de acordo com os procedimentos descritos no apêndice 2. Dois a sete dias antes do início do ensaio, o solo artificial seco é humedecido por adição de uma quantidade de água destilada ou desionizada suficiente para a obtenção de cerca de metade do teor final de água, ou seja, 40 a 60 % da capacidade máxima de retenção de água. O teor de humidade é ajustado para 40-60 % da capacidade máxima de retenção de água com a solução do produto químico em estudo e/ou com água destilada ou desionizada (ver pontos 16 a 18). Pode proceder-se a uma verificação complementar simples do teor de humidade do solo comprimindo delicadamente uma amostra na mão; se o teor de humidade for correto, observam-se gotículas de água entre os dedos.

13. O teor de humidade do solo é determinado no início e no final do ensaio por secagem a peso constante, a 105 °C, em conformidade com a norma ISO 11465 (17), sendo o pH do solo determinado em conformidade com o apêndice 3 ou com a norma ISO 10390 (14). Estas medições devem ser efetuadas em amostras adicionais sem ácaros, tanto do solo de controlo como do solo de cada concentração de ensaio. O pH do solo não deve ser ajustado quando se sujeitem a ensaio produtos químicos ácidos ou básicos. O teor de humidade deve ser monitorizado durante o ensaio, pesando periodicamente os recipientes (ver pontos 20 e 24).

Seleção e preparação dos animais para ensaio

14. A espécie utilizada no ensaio é a *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* (Canestrini, 1883). O ensaio inicia-se com fêmeas adultas recolhidas de uma coorte sincronizada. Os ácaros devem ser introduzidos cerca de 7 a 14 dias após se tornarem adultos, 28 a 35 dias após o início da postura dos ovos na sincronização (ver ponto 3 e apêndice 4). Devem registar-se a proveniência ou o fornecedor dos ácaros e a manutenção da cultura laboratorial. Se for mantida uma cultura laboratorial, recomenda-se que a identidade da espécie seja confirmada pelo menos uma vez por ano. O apêndice 6 apresenta um modelo de ficha de identificação.

Preparação das concentrações de ensaio

15. O produto químico é incorporado no solo. Os solventes orgânicos utilizados como auxiliares do tratamento do solo com o produto químico em estudo devem ser selecionados em função da sua baixa toxicidade para os ácaros, devendo o procedimento de ensaio incluir um controlo adequado do solvente (ver ponto 29).

Produtos químicos solúveis em água

16. Prepara-se uma solução do produto químico em estudo em água desionizada numa quantidade suficiente para todos as replicados de uma concentração de ensaio. Recomenda-se a utilização de uma quantidade de água suficiente para obter o teor de humidade necessário, isto é, 40 a 60 % da capacidade máxima de retenção de água (ver ponto 12). Cada solução do produto químico é misturada de forma homogénea num lote de solo previamente humedecido, antes da introdução deste no recipiente de ensaio.

▼M6

Produtos químicos insolúveis em água

17. Os produtos químicos insolúveis em água mas solúveis em solventes orgânicos podem ser dissolvidos no volume mais baixo possível de um solvente adequado (por exemplo, acetona). Só devem utilizar-se solventes voláteis. Se forem utilizados tais veículos, todas as concentrações de ensaio e controlo devem conter a mesma quantidade mínima do veículo. O veículo é aspergido sobre uma pequena quantidade (por exemplo, 10 g) de areia de quartzo fina ou misturado com ela. O teor total de areia do substrato deve ser corrigido para esta quantidade. O veículo é eliminado por evaporação num exaustor durante, pelo menos, uma hora. Esta mistura de areia de quartzo e produto químico é misturada com o solo previamente humedecido, procedendo-se a uma homogeneização cuidadosa após a adição da quantidade de água desionizada adequada para obter o teor de humidade necessário. Introduz-se a mistura final nos recipientes de ensaio. De notar que alguns solventes podem ser tóxicos para os ácaros. Recomenda-se, por conseguinte, a utilização de um controlo suplementar com água sem o veículo, caso não seja conhecida a toxicidade do solvente para os ácaros. Se for devidamente demonstrado que, nas concentrações a aplicar, o solvente não tem efeitos, pode suprimir-se o controlo com água.

Produtos químicos em estudo pouco solúveis em água e em solventes orgânicos

18. No caso de produtos químicos pouco solúveis em água ou em solventes orgânicos, mistura-se o equivalente de 2,5 g de areia de quartzo finamente moída por cada recipiente de ensaio (por exemplo, 10 g de areia de quartzo fina para quatro replicados) com a quantidade do produto químico em estudo, até obter a concentração de ensaio desejada. O teor total de areia do substrato deve ser corrigido para esta quantidade. Esta mistura de areia de quartzo e produto químico é misturada com o solo previamente humedecido, procedendo-se a uma homogeneização cuidadosa após a adição de uma quantidade de água desionizada adequada para obter o teor de humidade necessário. Divide-se a mistura final pelos recipientes de ensaio. Repete-se o procedimento para cada concentração de ensaio, preparando-se também um controlo adequado.

PROCEDIMENTO

Grupos de ensaio e grupos de controlo

19. Recomenda-se a utilização de 10 fêmeas adultas por 20 g de massa seca de solo artificial, para cada recipiente de controlo e de exposição. Os organismos de ensaio devem ser adicionados nas duas horas subsequentes à preparação do substrato de ensaio final, ou seja, após aplicação do produto químico em estudo. Em certos casos específicos (quando, por exemplo, o envelhecimento da população é considerado um fator determinante), o tempo decorrido entre a preparação do substrato de ensaio final e a adição dos ácaros pode ser prolongado [para mais pormenores, ver (18)]. Nesses casos, contudo, é necessário fornecer uma justificação científica.

20. Após a colocação dos ácaros no solo, fornece-se-lhes alimento, devendo determinar-se o peso inicial de cada frasco de ensaio, a utilizar como referência para o controlo do teor de humidade do solo durante o ensaio, como descrito no ponto 24. Os recipientes de ensaio são cobertos de acordo com o ponto 8 e colocados na câmara de ensaio.

21. Preparam-se amostras-controlo adequadas para cada um dos métodos de aplicação do produto químico em estudo descritos nos pontos 15 a 18. Seguem-se os procedimentos descritos para preparar os controlos, exceto que não é adicionado o produto químico em estudo. Assim, quando necessário, aplicam-se aos controlos solventes orgânicos, areia de quartzo ou outros veículos, em concentrações ou quantidades semelhantes às utilizadas nas amostras de ensaio. Se se adicionar um solvente ou outro veículo ao produto químico em estudo, deve-se também preparar e submeter a ensaio uma amostra suplementar de controlo sem o veículo ou o produto químico em estudo, caso a toxicidade do solvente não seja conhecida (ver ponto 17).

▼M6

Condições de realização do ensaio

22. A temperatura de ensaio deve ser de 20 ± 2 °C. Deve ser registada, pelo menos, diariamente e, se necessário, ajustada. O ensaio é efetuado em ciclos luz/obscuridade (de preferência, 16 horas de luz e 8 horas de obscuridade), com iluminação de 400 a 800 lux na zona dos recipientes de ensaio. Por razões de comparabilidade, estas condições são idênticas às dos outros ensaios ecotoxicológicos com solo [por exemplo, (15)].

23. Caso se utilizem tampas de rosca, deve garantir-se o intercâmbio de gases mediante o arejamento dos recipientes de ensaio, pelo menos duas vezes por semana. Se forem utilizadas coberturas de gaze, importa dar especial atenção à manutenção do teor de humidade do solo (ver pontos 8 e 24).

24. O teor em água do substrato edáfico nos recipientes de ensaio é mantido ao longo do ensaio, através de pesagem e, se necessário, de reidratação periódica (por exemplo, uma vez por semana) dos recipientes. As perdas são compensadas, na medida do necessário, com água desionizada. O teor de humidade durante o ensaio não deve diferir do valor inicial em mais de 10 %.

Alimentação

25. Os ácaros-do-queijo [*Tyrophagus putrescentiae* (Schrank, 1781)] revelaram ser uma fonte alimentar adequada. São também adequados colêmbolos de prequenas dimensões [por exemplo, juvenis de *Folsomia candida* Willem, 1902 ou *Onychiurus fimatus* (19) (20)], enquitreídeos (por exemplo, *Enchytraeus crypticus* Westheide & Graefe, 1992) ou nemátodos (por exemplo, *Turbatrix silusiae* de Man, 1913) (21). É aconselhável verificar o alimento antes da sua utilização no ensaio. O tipo e a quantidade de alimento devem assegurar um número adequado de juvenis, a fim de cumprir os critérios de validade (ponto 6). Para a seleção das presas, deve ter-se em conta o modo de ação do produto químico em estudo (um acaricida, por exemplo, pode ser também tóxico para os ácaros presentes nos alimentos — ver ponto 26).

26. O alimento deve ser fornecido *ad libitum* (ou seja, uma pequena quantidade de cada vez, com a ponta de uma espátula). Para o efeito, pode também utilizar-se um exaustor de baixa aspiração, como se propõe no ensaio com colêmbolos, ou uma escova fina. Em geral, bastará fornecer alimento no início do ensaio e, posteriormente, duas ou três vezes por semana. Se o produto químico em estudo se afigurar tóxico para as presas, deve ponderar-se fornecer uma maior quantidade de alimento e/ou uma fonte de alimentação alternativa.

Seleção das concentrações de ensaio

27. O conhecimento prévio da toxicidade do produto químico em estudo (por exemplo, com base em ensaios de determinação da gama de concentrações) contribui para a seleção das concentrações de ensaio adequadas. Quando necessário, efetua-se um ensaio preliminar de determinação da gama de concentrações com cinco concentrações do produto químico em estudo na gama 0,1-1 000 mg por kg de solo seco, prevendo-se, pelo menos, um replicado para as amostras de ensaio com o produto e os controlos. A duração do ensaio de determinação da gama de concentrações é de 14 dias, após o que se determina a mortalidade dos ácaros adultos e o número de juvenis. A gama de concentrações no ensaio final deve ser escolhida, de preferência, de forma a abranger as concentrações às quais, contrariamente à sobrevivência da geração materna, o número de juvenis é afetado. Contudo, isso poderá não ser possível no caso de produtos químicos que produzam efeitos letais e subletais a concentrações muito próximas. As concentrações testadas no ensaio devem incluir as concentrações às quais se observam efeitos (por exemplo, EC_{50}, EC_{25}, EC_{10}) e abranger a gama de concentrações para as quais os efeitos do produto químico em estudo são significativos. As extrapolações muito abaixo da menor concentração que afeta os organismos de ensaio ou muito acima da concentração de ensaio mais elevada devem ser feitas apenas em casos excecionais, a justificar circunstanciadamente no relatório.

Conceção experimental

Ensaios dose/resposta

28. Propõem-se três conceções, baseadas nas recomendações resultantes de outro estudo interlaboratorial comparativo — o método de reprodução

▼M6

com enquitreídeos (22). A adequação geral de todas essas conceções foi confirmada pelos resultados da validação com *H. aculeifer*.

29. Na escolha da gama de concentrações, importa ter presente o seguinte:

— Para a determinação da EC_x (por exemplo EC_{10}, EC_{50}), importa submeter a ensaio doze concentrações. Recomenda-se também preparar, pelo menos, dois replicados de cada concentração de ensaio e seis replicados de controlo. O fator de espaçamento pode ser inferior ou igual a 1,8 na gama com efeitos esperados e superior a 1,8 no caso das concentrações mais e menos elevadas.

— Para determinar a NOEC, devem submeter-se a ensaio, pelo menos, cinco concentrações em progressão geométrica. Recomenda-se a preparação de quatro replicados de cada concentração de ensaio, além de oito controlos. O fator de espaçamento entre as concentrações não pode ser superior a 2,0.

— Uma abordagem combinada permite determinar simultaneamente a NOEC e a EC_x. Devem utilizar-se oito concentrações de ensaio em progressão geométrica. Recomenda-se a preparação de quatro replicados de cada concentração de ensaio, além de oito controlos. O fator de espaçamento entre as concentrações não pode ser superior a 1,8.

Ensaio do limite

30. Se não se observarem efeitos com a concentração mais elevada no ensaio de determinação da gama de concentrações (1 000 mg por kg de peso seco de solo), o ensaio de reprodução definitivo pode ser executado como ensaio do limite, utilizando uma concentração de ensaio de 1 000 mg por kg de peso seco de solo. Um ensaio do limite representa uma oportunidade para demonstrar que a NOEC ou a EC_{10} para a reprodução é superior à concentração-limite, minimizando, ao mesmo tempo, o número de ácaros utilizados no ensaio. Devem utilizar-se oito replicados tanto para as amostras de ensaio como para as amostras de controlo.

Duração do ensaio e medições

31. Devem registar-se quaisquer diferenças de comportamento e de morfologia entre os ácaros dos recipientes de controlo e dos recipientes de exposição ao produto.

32. No 14.º dia, extraem-se do solo os ácaros sobreviventes, por ação de calor ou luz ou por outro método adequado (ver apêndice 5). Contabiliza-se separadamente o número de juvenis (larvas, protoninfas e deuteroninfas) e de adultos. Os adultos não detetados neste momento devem ser registados como mortos, pressupondo-se que morreram e se decompuseram antes da avaliação. A eficiência da extração deve ser validada uma ou duas vezes por ano, utilizando amostras de controlos com números conhecidos de adultos e juvenis. A eficiência deve ser superior a 90 % (média combinada para todas as fases de desenvolvimento — ver apêndice 5). Não se efetuam ajustamentos de eficiência com base nos adultos e nos juvenis.

DADOS E RELATÓRIOS

Tratamento dos resultados

33. Os pontos 36 a 41 apresentam informações sobre os métodos estatísticos que se podem utilizar na análise dos resultados do ensaio. Deve também consultar-se o documento n.º 54 da OCDE intitulado «*Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a Guidance to Application*» (31).

34. O principal parâmetro final é a produção de descendência, traduzida no número de juvenis produzidos por replicado (recipiente no qual se introduziram 10 fêmeas adultas). A análise estatística exige o cálculo da média

▼M6

aritmética (X) e da variância (s^2) da produção de descendência, por recipiente de exposição e de controlo. Os valores de X e s^2 são utilizados em métodos ANOVA como o teste t de Student e os testes de Dunnett ou de Williams, bem como para o cálculo de intervalos de confiança de 95 %.

Nota: O principal ponto final equivale à fecundidade, traduzida no número de juvenis vivos produzidos durante o ensaio, dividido pelo número de fêmeas progenitoras introduzidas no início do ensaio.

35. O número de fêmeas sobreviventes nas amostras de controlo não expostas ao produto constitui um importante critério de validade, pelo que deve ser documentado. Tal como no ensaio de determinação da gama de concentrações, todos os outros sinais de nocividade devem constar do relatório final.

EC_x

36. Os valores de EC_x, assim como os correspondentes limites de confiança a 95 % do parâmetro descrito no ponto 34, são calculados por recurso a métodos estatísticos adequados (análise da função probit, função logística ou de Weibull, método abreviado de Spearman-Karber ou simples interpolação). Determina-se a EC_x inserindo na equação obtida o valor correspondente a x % da média do grupo de controlo. Para calcular a EC_{50} ou qualquer outra EC_x, procede-se a uma análise de regressão da média das séries (X).

NOEC/LOEC

37. Caso se pretenda determinar a NOEC ou a LOEC por análise estatística, é necessário dispor de dados estatísticos por recipiente (sendo cada recipiente considerado um replicado). Devem utilizar-se métodos estatísticos adequados, de acordo com o documento n.º 54 da OCDE intitulado *Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application*. Em geral, investigam-se os efeitos nocivos do produto químico em estudo, comparativamente ao grupo de controlo, testando a hipótese unilateral (mais reduzida) para $p \leq 0,05$. Os pontos que se seguem apresentam vários exemplos.

38. A distribuição normal dos dados pode ser sujeita, por exemplo, ao teste de ajustamento de Kolmogorov-Smirnov, ao teste de rácio gama-desvio-padrão (teste R/s) ou ao teste dual de Shapiro-Wilk ($p \leq 0,05$). Para avaliar a homogeneidade da variância, pode recorrer-se aos testes de Cochran, de Levene ou de Bartlett (dual, $p \leq 0,05$). Se se cumprirem os requisitos dos testes paramétricos (normalidade homogeneidade da variância), podem realizar-se uma análise ANOVA e os testes multicomparativos subsequentes. Para averiguar se existem diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os controlos e as várias concentrações de ensaio do produto, podem utilizar-se comparações múltiplas (por exemplo, teste t de Dunnett) ou testes de tendência regressiva (por exemplo, teste de Williams no caso de uma relação monótona dose-resposta) (a seleção do teste recomendado é em conformidade com o documento n.º 54 da OCDE *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application*. Alternativamente, pode recorrer-se a métodos não paramétricos (por exemplo, teste U de Bonferroni na versão de Holm ou teste de tendências de Jonckheere-Terpstra) para determinar a NOEC ou a LOEC.

Ensaio do limite

39. Se se realizar um ensaio do limite (comparação de apenas uma amostra de controlo e uma amostra tratada com o produto) e se cumprirem os requisitos dos testes paramétricos (normalidade, homogeneidade), as respostas métricas podem ser avaliadas por um teste t de Student. Se não se cumprirem aqueles requisitos, pode recorrer-se a um teste t de variância desigual (teste de Welch) ou a um teste não paramétrico, como o teste U de Mann-Whitney.

40. Para detetar diferenças significativas entre os controlos (controlo e controlo com solvente), os replicados de cada controlo podem ser testados da forma descrita para o ensaio do limite. Se estes testes não detetarem diferenças

▼M6

significativas, podem agrupar-se todos os replicados de controlo e replicados de controlo com solvente. Caso contrário, todas as amostras tratadas com o produto devem ser comparadas com o controlo com solvente.

Relatório do ensaio

41. Os elementos mínimos que devem constar do relatório do ensaio são os seguintes:

— *Produto químico em estudo*

— identidade, nome, lote e número CAS, grau de pureza;

— propriedades físico-químicas (por exemplo, log K_{ow}, hidrossolubilidade, pressão de vapor, constante de Henry (H) e, de preferência, informações sobre o destino do produto químico no solo);

— *Organismos sujeitos a ensaio*

— identificação e fornecedor dos organismos de ensaio, descrição das condições de cultura;

— gama etária dos organismos.

— *Condições de realização do ensaio*

— descrição completa do método experimental e dos procedimentos;

— dados sobre a preparação do solo para o ensaio; se se utilizar solo natural, especificações pormenorizadas (origem, história, distribuição granulométrica, pH, teor de matéria orgânica e, se disponível, classificação do solo);

— capacidade máxima do solo para reter água;

— descrição da técnica utilizada para aplicar no solo o produto químico em estudo;

— informações sobre produtos químicos adjuvantes utilizados para administrar o produto químico em estudo;

— dimensões dos recipientes de ensaio e massa seca de solo por cada recipiente de ensaio;

— condições de ensaio: intensidade luminosa, duração dos ciclos luz/ /obscuridade, temperatura;

— descrição do regime alimentar, tipo e quantidade de alimento utilizado no ensaio, datas de alimentação;

— pH e teor de humidade do solo no início e ao longo do ensaio (amostras de controlo e de exposição ao produto);

— descrição pormenorizada do método de extração e eficiência da extração.

— *Resultados do ensaio*

— número de juvenis contados em cada recipiente, no final do ensaio;

— número de fêmeas adultas e mortalidade dos adultos (%) em cada recipiente, no final do ensaio;

— descrição de sintomas evidentes ou de alterações comportamentais evidentes;

— resultados obtidos com o produto químico de referência;

— estatísticas sumárias (EC_x e/ou NOEC), incluindo limites de confiança a 95 % e descrição do método de cálculo;

▼**M6**

— representação gráfica da relação concentração-resposta;

— desvios aos procedimentos descritos no presente método e quaisquer ocorrências anómalas durante o ensaio.

REFERÊNCIAS

(1) Casanueva, M.E. (1993). Phylogenetic studies of the free-living and arthropod associated Laelapidae (Acari: Mesostigmata). Gayana Zool. 57, 21--46.

(2) Tenorio, J. M. (1982). Hypoaspidinae (Acari: Gamasida Laelapidae) of the Hawaiian Islands. Pacific Insects 24, 259-274.

(3) Bakker, F.M., Feije, R., Grove, A. J., Hoogendorn, G., Jacobs, G., Loose, E.D. & van Stratum, P. (2003). A laboratory test protocol to evaluate effects of plant protection products on mortality and reproduction of the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* Canestrini (Acari: Laelapidae) in standard soil. JSS — Journal of Soils and Sediments 3, 73-77.

(4) Karg, W. (1993). Die freilebenden Gamasina (Gamasides), Raubmilben. 2nd edition In: Dahl, F. (Hrsg.): Die Tierwelt Deutschlands 59. Teil, G. Fischer, Jena, 523 pp.

(5) Ruf, A. (1991). Do females eat males?: Laboratory studies on the popualation development of *Hypoaspis aculeifer* (Acari: Parasitiformes). In: F. Dusbabek & V. Bukva (eds.): Modern Acarology. Academia Prague & SPD Academic Publishing bv, The Hague, Vol. 2, 487-492

(6) Ruf, A. (1995). Sex ratio and clutch size control in the soil inhabiting predatory mite *Hypoaspis aculeifer* (Canestrini 1883) (Mesostigmata, Dermanyssidae). Proc. 2nd Symp. EURAAC: 241-249

(7) Ruf, A. (1996). Life-history patterns in soil-inhabiting mesostigmatid mites. Proc. IXth Internat. Congr. Acarol. 1994, Columbus, Ohio: 621-628

(8) Krogh, P.H. & Axelsen, J.A. (1998). Test on the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* preying on the collembolan *Folsomia fimetaria*. In: Lokke, H. & van Gestel, C.A.M.: Handbook of soil invertebrate toxicity tests. John Wiley Sons, Chichester, p 239-251.

(9) Løkke, H., Janssen, C.R., Lanno, R.P., Römbke, J., Rundgren, S. & Van Straalen, N.M. (2002). Soil Toxicity Tests — Invertebrates. In: Test Methods to Determine Hazards of Sparingly Soluble Metal Compounds in Soils. Fairbrother, A., Glazebrook, P.W., Van Straalen, N.M. & Tarazona, J.V. (eds.). SETAC Press, Pensacola, USA. 128 pp.

(10) Schlosser, H.-J. & Riepert, F. (1991/92). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina). Teil 1: Biologie der Bodenraubmilbe Hypoaspis aculeifer Canestrini, 1883 (Gamasina) unter Laborbedingungen. Zool. Beiträge, 34, 395-433.

(11) Schlosser, H.-J. & Riepert, F. (1992). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Boden-raubmilben (Gamasina). Teil 2: Erste Ergebnisse mit Lindan und Kaliumdichromat in subletaler Dosierung. Zool. Beitr. N.F. 34, 413-433.

(12) Heckmann, L.-H., Maraldo, K. & Krogh, P. H. (2005). Life stage specific impact of dimethoate on the predatory mite Hypoaspis aculeifer Canestrini (Gamasida: Laelapidae Environmental Science & Technology 39, 7154--7157.

(13) Petersen, H. (1978). Some properties of two high-gradient extractors for soil microarthropods, and an attempt to evaluate their extraction efficiency. Natura Jutlandica 20, 95-122.

(14) ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality — Determination of pH, No. 10390. ISO, Geneve.

▼**M6**

(15) Capítulo C.8 do presente anexo (Toxicidade em relação às minhocas).

(16) OCDE (2003). EPPO Standards. Environmental risk assessment scheme for plant protection products. Chapter 8. Soil Organisms and Functions. Bull. OEPP/EPPO Bull. 33, 195-209.

(17) ISO (International Organization for Standardization) (1993). Soil Quality –Determination of dry matter and water content on a mass basis — Gravimetric method, No. 11465. ISO, Geneve.

(18) Fairbrother, A., Glazebrock, P.W., Van Straalen, N.M. & Tarazona, J.V. 2002. Test methods to determine hazards of sparingly soluble metal compounds in soils. SETAC Press, Pensacola, FL, USA.

(19) Chi, H. 1981. Die Vermehrungsrate von Hypoaspis aculeifer Canestrini (Acarina, Laelapidae) bei Ernährung mit Onychiurus fimatus Gisin (Collenbola). Ges.allg..angew. Ent. 3:122-125.

(20) Schlosser, H.J., und Riepert, F. 1992. Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilden (Gamasina). Zool.Beitr. N.F. 34 3 16 395 -433

(21) Heckmann, L.-H., Ruf, A., Nienstedt, K. M. & Krogh, P. H. 2007. Reproductive performance of the generalist predator Hypoaspis aculeifer (Acari: Gamasida) when foraging on different invertebrate prey. Applied Soil Ecology 36, 130-135.

(22) Capítulo C.32 do presente anexo (Ensaio de reprodução com enquitreídeos).

(23) ISO (Organização Internacional de Normalização) (1994). Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (Eisenia fetida). *Part 2*: *Determination of effects on reproduction* (11268)]. ISO, Geneve.

(24) Southwood, T.R.E. (1991). Ecological methods. With particular reference to the study of insect populations. (2nd ed.). Chapman & Hall, London, 524 pp.

(25) Dunger, W. & Fiedler, H.J. (1997). Methoden der Bodenbiologie (2nd ed.). G. Fischer, Jena, 539 pp.

(26) Lesna, I. & Sabelis, M.W. (1999). Diet-dependent female choice for males with «good genes» in a soil predatory mite. Nature 401, 581-583.

(27) Ruf, A. (1989). Die Bedeutung von Arrhenotokie und Kannibalismus für die Populationsentwicklung von Hypoaspis aculeifer (Canestrini 1883) (Acari, Gamasina). Mitt. Deut. Ges. Allg. Angew. Ent. 7, 103-107.

(28) Ruf, A. (1993). Die morphologische Variabilität und Fortpflanzungsbiologie der Raubmilbe Hypoaspis aculeifer (Canestrini 1883) (Mesostigmata, Dermanyssidae). Dissertation, Universität Bremen.

(29) Ignatowicz, S. (1974). Observations on the biology and development of Hypoaspis aculeifer Canestrini, 1885 (Acarina, Gamasides). Zoologica Poloniae 24, 11-59.

(30) Kevan, D.K. McE. & Sharma, G.D. (1964). Observations on the biology of Hypoaspis aculeifer (Canestrini, 1884), apparently new to North America (Acarina: Mesostigmata: Laelaptidae). Acarologia 6, 647-658.

(31) OECD (2006c). *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application*. OECD environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.54. ENV/JM/MONO(2006)18

▼M6

Apêndice 1

Definições

Para efeitos do presente método de ensaio, aplicam-se as definições que se seguem (neste ensaio, as concentrações com efeitos são expressas em massa do produto químico em estudo por massa seca de solo utilizado):

Produto químico: uma substância ou mistura.

NOEC (concentração sem efeitos observáveis): concentração do produto químico em estudo à qual não se observa nenhum efeito do mesmo. Neste ensaio, a concentração NOEC não tem nenhum efeito com significância estatística ($p < 0,05$) num determinado período de exposição, comparativamente ao grupo de controlo.

LOEC (menor concentração com efeito observável): menor concentração do produto químico em estudo que tem um efeito estatisticamente significativo ($p < 0,05$) num determinado período de exposição, comparativamente ao grupo de controlo.

EC_x (concentração com x % de efeitos): concentração que causa efeitos em x % dos organismos ensaiados num determinado período de exposição, comparativamente ao grupo de controlo. Por exemplo, a EC_{50} é a concentração que se estima que, num ponto final do ensaio, terá efeito em 50 % da população exposta, num período de exposição definido.

Produto químico em estudo: qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado o presente método de ensaio.

▼**M6**

Apêndice 2

Determinação da capacidade máxima do solo para reter água (capacidade máxima de retenção de água)

O método que se segue é considerado adequado para determinar a capacidade máxima de retenção de água do solo. Está descrito no anexo C da norma ISO DIS 11268-2 [*Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (Eisenia fetida). Part 2: Determination of effects on reproduction* (23)].

Recolher uma determinada quantidade (por exemplo, 5 g) de substrato do solo de ensaio com o auxílio de um instrumento adequado (tubo Auger, etc.). Cobrir o fundo do tubo com um pedaço de papel de filtro e, após o enchimento com água, introduzi-lo num suporte de banho-maria. O tubo deve ser submergido gradualmente, até que o nível de água se situe acima do topo da camada de solo. Deixar o tubo no banho-maria durante cerca de três horas. Dado não ser possível reter toda a água absorvida por capilaridade, deve deixar-se a amostra de solo escorrer durante duas horas, colocando o tubo num leito de areia de quartzo finamente moída e muito húmida, contido num recipiente coberto (para evitar a secagem). A amostra deve, em seguida, ser pesada e seca até massa constante à temperatura de 105 °C. A capacidade de retenção de água (WHC) pode ser calculada do seguinte modo:

$$\text{WHC(em \% da massa seca)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

em que:

S = substrato saturado de água + massa do tubo + massa do papel de filtro

T = tara (massa do tubo + massa do papel de filtro)

D = massa seca de substrato

▼**M6**

Apêndice 3

Determinação do ph do solo

O seguinte método de determinação do pH de uma amostra de solo baseia-se na descrição da norma ISO DIS 10390: Qualidade do solo – Determinação do pH (16).

Seca-se uma determinada quantidade de solo à temperatura ambiente, durante, pelo menos, 12 h. Prepara-se então uma suspensão que contenha, pelo menos, 5 g de solo, à qual se adiciona cinco vezes o seu volume de uma solução 1 M de cloreto de potássio (KCl) de qualidade analítica ou de uma solução 0,01 M de cloreto de cálcio ($CaCl_2$) também de qualidade analítica. Agita-se a suspensão vigorosamente durante cinco minutos, deixando-se de seguida em repouso durante, pelo menos, 2 horas, mas não mais de 24 horas. O pH da fase líquida é então medido por recurso a um medidor de pH, calibrado, antes de cada medição, com uma série adequada de soluções-tampão (por exemplo, pH 4,0 e 7,0).

▼M6

Apêndice 4

Criação de ácaros da espécie *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* e sincronização da cultura

Criação de *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*

As culturas podem ser mantidas em recipientes de plástico ou frascos de vidro com uma mistura de gesso de Paris e carvão vegetal em pó (9:1). Para manter o gesso húmido, acrescentar algumas gotas de água destilada ou desionizada, se necessário. A temperatura ótima é da ordem de 20 ± 2 °C; o regime luz/obscuridade não é relevante para a espécie em causa. As presas podem ser das espécies *Typrophagus putrescentiae* ou *Caloglyphus* sp. (os ácaros dos alimentos devem ser manipulados com cuidado, dado poderem provocar alergias no homem); nemátodos, enquitreídeos e colêmbolos são também presas adequadas. A sua origem deve ser registada. A proliferação da população pode ter início com uma única fêmea, dado que se desenvolvem machos a partir de ovos não fecundados. Regista-se uma ampla sobreposição de gerações. As fêmeas vivem, pelo menos, 100 dias, durante os quais põem cerca de 100 ovos. A taxa de postura máxima é atingida 10 a 40 dias após se tornarem adultas, sendo da ordem de 2,2 ovos fêmea^{-1} dia^{-1}. O desenvolvimento das fêmeas adultas a partir dos ovos dura cerca de 20 dias, a 20 °C. Deve manter-se mais de uma cultura.

Criação de *Tyrophagus putrescentiae*

Os ácaros são mantidos num recipiente de vidro contendo levedura de cerveja finamente pulverizada, colocado num balde de plástico cheio de uma solução de KNO_3, para que não possam escapar. Os ácaros dos alimentos são colocados no topo da levedura pulverizada. De seguida, com o auxílio de uma espátula, são cuidadosamente misturados com esta última (que tem de ser substituída duas vezes por semana).

Sincronização da cultura

Os espécimes utilizados no ensaio devem ter aproximadamente a mesma idade (cerca de 7 dias depois de atingirem a fase adulta). À temperatura de 20 °C, o procedimento é o seguinte:

Transferem-se as fêmeas para um recipiente limpo e fornece-se-lhes uma quantidade suficiente de alimento.

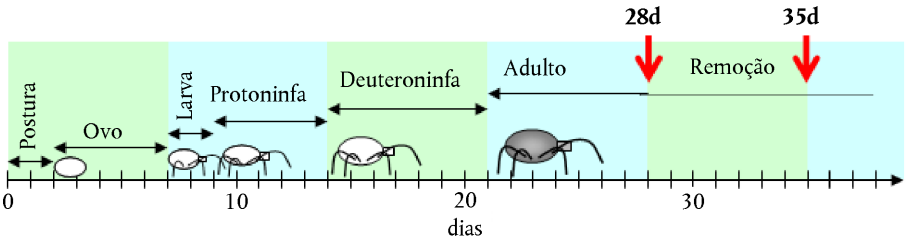
— Após dois ou três dias de postura, removem-se as fêmeas;

— Recolhem-se as fêmeas adultas para os ensaios entre o 28.º e o 35.º dias após a sua colocação nos recipientes limpos.

As fêmeas adultas distinguem-se facilmente dos machos e dos espécimes em outras fases de desenvolvimento pela sua maior dimensão, forma inflada e cor acastanhada da cutícula dorsal (os machos são mais finos e aplanados); os espécimes imaturos têm cor branca a creme. A 20 °C, o desenvolvimento dos ácaros segue aproximadamente o modelo que se descreve em seguida (ver figura): postura dos ovos: 5 dias; fase de larva: 2 dias; fase de protoninfa: 5 dias; fase de deuteroninfa: 7 dias; período de pré-postura das fêmeas: 2 dias. Decorridas estas fases, os ácaros são adultos.

Figura

Desenvolvimento da espécie *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* a 20 °C (remoção = fêmeas utilizadas para ensaio)



▼**M6**

Retiram-se da cultura sincronizada os animais adultos para ensaio e introduzem-se nos recipientes de ensaio entre o 28.º e o 35.º dias após o início da postura das fêmeas progenitoras (ou seja, 7 a 14 dias depois de se terem tornado adultos). Garante-se assim que as fêmeas a utilizar nos ensaios tenham ultrapassado o período de pré-postura e sido fecundadas pelos machos também presentes no recipiente. As observações de culturas em laboratório sugerem que, se estiverem presentes machos, as fêmeas acasalam imediatamente ou pouco depois de se tornarem adultas (Ruf, Vaninnen, obs. pes.). O período de sete dias foi escolhido para facilitar a integração na rotina laboratorial e atenuar a variabilidade individual no desenvolvimento dos ácaros. A postura deve ter início com um número de fêmeas, pelo menos, igual ao que for necessário para o ensaio (por exemplo, se forem necessárias 400 fêmeas, deve garantir-se a postura de, no mínimo, 400 fêmeas, durante dois a três dias). Como ponto de partida para a sincronização da população, deve dispor-se, pelo menos, de 1 200 ovos (rácio entre os sexos cerca de 0,5; mortalidade cerca de 0,2). Para evitar o canibalismo, é mais fácil manter num recipiente um máximo de 20 a 30 fêmeas em postura.

▼M6

Apêndice 5

Métodos de extração

No caso dos microartrópodes, a extração com calor constitui um método adequado para retirar os espécimes do solo ou do substrato (ver figura abaixo). O método baseia-se na atividade dos organismos, pelo que apenas os espécimes móveis têm a possibilidade de ser registados. O princípio da extração com calor consiste em criar condições progressivamente mais inóspitas para os organismos na amostra até eles abandonarem o substrato, caindo num líquido de fixação (por exemplo, etanol). Os pontos cruciais são a duração da extração e o gradiente de condições boas a moderadas e más para os organismos. A duração da extração para ensaios ecotoxicológicos tem de ser tão curta quanto possível, uma vez que qualquer crescimento da população durante a extração falsifica os resultados. Por outro lado, as condições de temperatura e humidade da amostra devem situar-se sempre numa gama que permita a movimentação dos ácaros. O aquecimento de uma amostra de solo conduz à secagem do substrato. Se a secagem for demasiado rápida, alguns ácaros podem também sofrer dessecação antes de conseguirem escapar.

Nesta conformidade, o procedimento proposto é o seguinte [(24) (25)]:

Equipamento: funil de Tullgren ou métodos comparáveis, como, por exemplo, o de McFadyen (aquecimento vindo de cima, sendo a amostra colocada num funil).

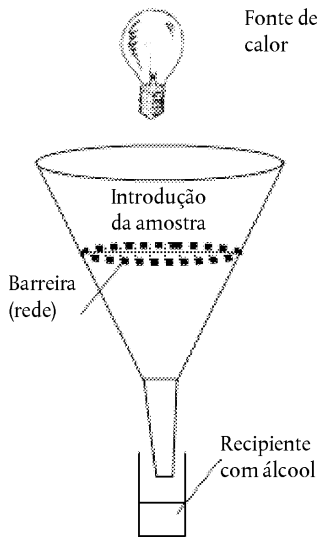
Regime de aquecimento: 25 °C durante 12 horas, 35 °C durante 12 horas e 45 °C durante 24 horas (no total, 48 horas). A temperatura do substrato deve ser medida.

Líquido de fixação: etanol a 70 %.

Procedimento: Utilizar o recipiente de vidro de ensaio. Remover a tampa e colocar uma rede ou um pedaço de tecido em torno da abertura. O tecido deve ter uma malha de 1,0 a 1,5 mm. Fixá-lo com um elástico. Inverter cuidadosamente o recipiente de ensaio e introduzi-lo no dispositivo de extração. O tecido impede o substrato de passar para o líquido de fixação, mas permite que os ácaros abandonem a amostra. Iniciar o aquecimento quando todos os recipientes estiverem inseridos no dispositivo. Terminar a extração após 48 horas. Remover os recipientes de fixação e contar os ácaros por meio de um microscópio de dissecação.

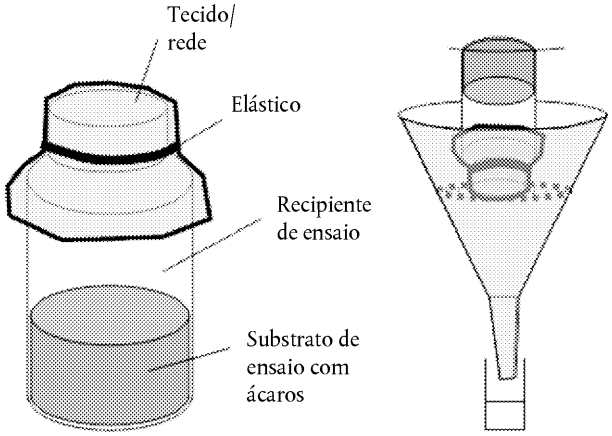
A eficácia da extração do método escolhido deve ser comprovada uma ou duas vezes por ano, por recurso a recipientes que contenham um número conhecido de ácaros juvenis e adultos mantidos em substrato de ensaio não tratado. A eficiência deve ser ≥ 90 % (média combinada para todos as fases de desenvolvimento).

Dispositivo de extração do tipo Tullgren



▼**M6**

Como preparar o recipiente após a conclusão do ensaio, antes da extração



▼**M6**

Apêndice 6

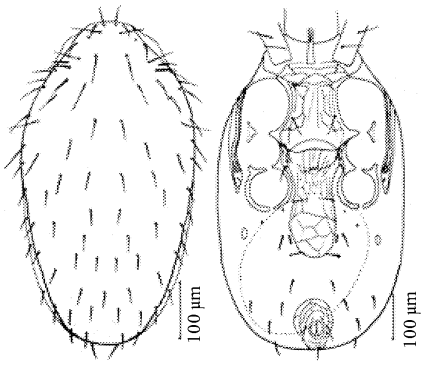
Identificação de *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*

Subclasse/ ordem/ subordem	Família	Género/ subgénero/ espécie
Acari/Parasitiformes/Gamasida	Laelapidae	*Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*

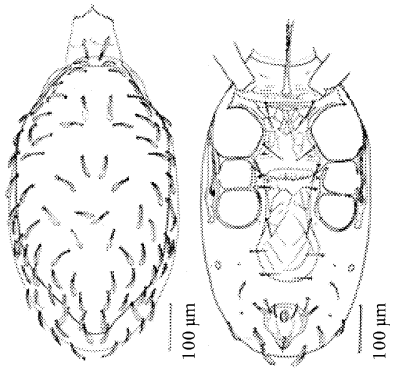
Autor e data:	F. Faraji, Ph.D. (MITOX), 23.01.2007

Bibliografia:	Karg, W. (1993). Die freilebenden Gamasina (Gamasides), Raubmilben. Tierwelt Deutschlands 59, 2nd revised edition: 1-523. Hughes, A.M. (1976). The mites of stored food and houses. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Technical Bulletin 9: 400pp. Krantz, G.W. (1978). A manual of Acarology. Oregon State University Book Stores, Inc., 509 pp.

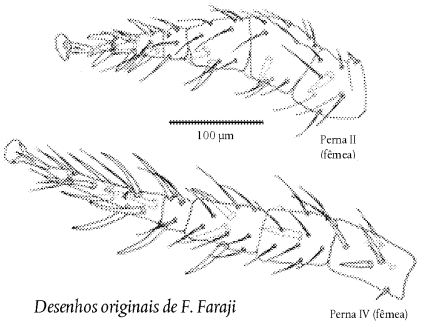
Características morfológicas:	Epistoma com arestas arredondadas denticuladas; ranhuras hipostomáticas com mais de 6 dentículos; sedas dorsais caudais de Z4 não muito longas; sedas dorsais setiformes; cutícula genital normal, não muito alargada e não alcançando a cutícula anal; metade posterior da cutícula dorsal sem sedas desemparelhadas; pernas II e IV com algumas macrossedas espessas; sedas dorsais Z5 com comprimento aproximadamente duplo de J5; nas quelíceras, dedos fixos com 12 a 14 dentes e dedos móveis com 2 dentes; idiossoma com comprimento 520-685 µm. A *Hypoaspis miles* também é utilizada em ensaios biológicos e pode confundir-se com a *H. aculeifer*. Principal diferença: A *H. miles* pertence ao subgénero *Cosmolaelaps* e apresenta sedas dorsais anguladas, enquanto a *H. aculeifer* pertence ao subgénero *Geolaelaps* e apresenta sedas dorsais setiformes.



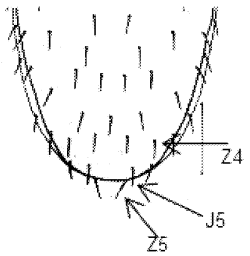
Hypoaspis aculeifer (Hughes, 1976)



Hypoaspis miles (Hughes, 1976)



Desenhos originais de F. Faraji



Hypoaspis aculeifer,
cutícula dorsal com sedas características

▼M6

Apêndice 7

Informações de base sobre a biologia de *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*

A espécie *Hypoaspis aculeifer* pertence à família *Lealapidae*, ordem *Acari* (ácaros), classe *Arachnida*, filo *Arthropoda*. Vive em todos os tipos de solo e alimenta-se de outros ácaros, nemátodos, enquitreídeos e colêmbolos (26). Em caso de escassez de alimentos, pode manifestar canibalismo (27). O corpo dos ácaros predadores divide-se em idiossoma e gnatossoma. Não existe diferenciação clara do idiossoma em prossoma (cabeça) e opistossoma (abdómen). O gnatossoma (cutícula da cabeça) contém os instrumentos de alimentação, designadamente palpos e quelíceras. As quelíceras são trifurcadas e munidas de dentes de formas diferentes. Para além da ingestão, os machos utilizam as quelíceras principalmente para transferir os espermatóforos para as fêmeas. A cutícula dorsal cobre quase completamente o idiossoma. Uma grande parte do idiossoma das fêmeas é ocupada pelos órgãos reprodutores, particularmente salientes antes da postura dos ovos. Na face ventral, encontram-se duas cutículas, a esternal e a genital. Todas as patas estão munidas de sedas e espinhos. As sedas servem para fixação, quando o animal se desloca no solo. O primeiro par de patas é utilizado principalmente como antena. O segundo par é utilizado, não só para locomoção, mas também para agarrar as presas. Os espinhos do quarto par de patas podem servir de proteção, bem como de «motores» de locomoção (28). Os machos têm 0,55 a 0,65 mm de comprimento e 10 a 15 µg de peso. As fêmeas têm 0,8 a 0,9 mm de comprimento e 50 a 60 µg de peso, (8) (28) (figura 1).

Figura 1

Fêmea, macho, protoninfa e larvas de *H. aculeifer*



A 23 °C, os ácaros atingem a maturidade sexual ao cabo de 16 dias (fêmeas) e 18 dias (machos) (6). As fêmeas recolhem os espermatozóides pelo solenostoma, do qual os espermatozóides passam para o ovário, onde sofrem maturação e são armazenados. A fertilização ocorre apenas após maturação dos espermatozóides no ovário. Os ovos, fecundados ou não, são postos pelas fêmeas em conjuntos ou separadamente, de preferência em fendas e orifícios. As fêmeas fecundadas produzem juvenis de ambos os sexos, enquanto as fêmeas não fecundadas produzem apenas juvenis machos. Durante o desenvolvimento até se tornarem adultos, os ácaros predadores passam por quatro fases — ovos, larvas, protoninfas, deutoninfas e adultos.

Os ovos têm uma coloração branca leitosa, hialina; são de forma elítica e têm cerca de 0,37 mm de comprimento, com um manto sólido. De acordo com a referência (8), as dimensões das larvas oscilam entre 0,42 e 0,45 mm. Têm apenas três pares de patas. Na região da cabeça, os palpos e as quelíceras estão já desenvolvidos. As quelíceras, munidas de pequenos dentículos, são utilizadas para a eclosão do ovo. As protoninfas desenvolvem-se na sequência da primeira metamorfose, 1 a 2 dias após a eclosão. Têm igualmente cor branca; as suas

▼**M6**

dimensões são da ordem de 0,45 a 0,62 mm (8) e têm quatro pares de patas. Nas quelíceras, os dentes estão já presentes na totalidade. Os ácaros começam a procurar alimento nesta fase. A cutícula das presas é furada com as quelíceras, sendo a presa impregnada de uma secreção para digestão extraintestinal. O ácaro aspira em seguida o bolo alimentar. As quelíceras também podem ser utilizadas para fragmentar partículas alimentares de maiores dimensões (28). Após uma nova metamorfose, desenvolvem-se as deuteroninfas. Têm 0,60 a 0,80 mm (8) de comprimento e coloração amarela a castanha clara. Nesta fase, são distinguíveis fêmeas e machos. Após nova metamorfose (com cerca de 14 dias de duração), no decurso da qual estão inativos e se desenvolve a cutícula acastanhada, os ácaros tornam-se adultos (28) (29) (30). A sua esperança de vida varia de 48 a 100 dias, a 25 °C (27).

▼**M6**

Apêndice 8

Resumo e calendário das principais ações a executar no ensaio com *Hypoaspis*

Tempo (dias) início do ensaio = dia 0	Atividade / tarefa
Dia – 35 a – 28	Transferência das fêmeas provenientes da cultura de reserva para recipientes limpos, para o início da sincronização 2 dias depois: remoção das fêmeas Duas ou três vezes por semana: fornecimento de alimento em quantidade suficiente
Dia – 5 (+/- 2)	Preparação do solo artificial
Dia – 4 (+/- 2)	Determinação da capacidade de retenção de água do solo artificial Secagem de um dia para o outro Dia seguinte: pesagem das amostras e cálculo da capacidade de retenção de água
Dia – 4 (+/- 2)	Pré-humedecimento do solo artificial, até totalizar 20 - 30 % da capacidade de retenção de água
Dia 0	Início do ensaio: mistura do produto químico em estudo no solo artificial Introdução de 10 fêmeas por replicado Pesagem dos replicados Preparação dos controlos abióticos do teor de humidade e do pH (2 replicados por cada amostra de exposição) Controlos de humidade a seco de um dia para o outro Dia seguinte: Controlos de humidade a seco Dia seguinte: Medição do pH dos controlos abióticos a seco
Dias 3, 6, 9 e 12 (aproximadamente)	Fornecimento a cada replicado de uma quantidade suficiente de presas Pesagem de cada replicado e adição de água evaporada
Dia 14	Finalização do ensaio, preparação da extração com todos os replicados e amostras de controlo da eficiência de extração Controlos do teor de água a seco de um dia para o outro Dia seguinte: pesagem das amostras de controlo do teor de água Dia seguinte: medição do pH das amostras de controlo a seco
Dia 16	Fim da extração
Dias 16+	Registo do número de adultos e juvenis nos materiais extraídos Registo dos resultados em quadros-modelo Registo do procedimento de ensaio em folhas de protocolo.

▼M6

C.37. ENSAIO A 21 DIAS EM PEIXES: DESPISTAGEM A CURTO PRAZO DE ATIVIDADE ESTROGÉNICA E ANDROGÉNICA E DE INIBIÇÃO DA AROMATASE

INTRODUÇÃO

1. Este método é equivalente ao *Test Guideline* TG 230 (2009) da OCDE. A necessidade de desenvolver e validar um ensaio em peixes capaz de detetar determinados produtos químicos com atividade endócrina decorre dos receios acerca da possibilidade de os níveis ambientais dos produtos químicos em causa serem passíveis de ter efeitos indesejados nas populações humanas e na fauna e flora selvagens, devido a interações dos referidos produtos químicos com o sistema endócrino. Em 1998, a OCDE deu início a uma ação de elevada prioridade com vista à revisão das orientações existentes e à elaboração de novas orientações para despistagem e ensaio de potenciais desreguladores do sistema endócrino. Um dos elementos dessa ação foi a elaboração de um *Test Guideline* para a despistagem de produtos químicos com atividade no sistema endócrino de espécies de peixes. O Ensaio de Despistagem de Atividade Endócrina a 21 dias em Peixes foi objeto de um vasto programa de validação, que consistiu na realização de estudos interlaboratoriais com determinados produtos químicos para demonstrar a pertinência e a fiabilidade do ensaio na deteção de produtos químicos com atividade estrogénica e inibidora da aromatase (1)(2)(3)(4)(5) nas três espécies de peixes investigadas — o vairão-de-cabeça-gorda (*Pimephales promelas*), o peixe-do-arroz-japonês (*Oryzias latipes*) e o peixe-zebra (*Danio rerio*). É possível detetar atividade androgénica no vairão-de-cabeça-gorda e no peixe-do-arroz-japonês, mas não no peixe-zebra, sendo que o método de ensaio também não permite detetar produtos químicos com atividade antiandrogénica. O trabalho de validação foi objeto de uma avaliação por pares no âmbito de um painel de peritos nomeados pelos coordenadores nacionais do programa de *Test Guidelines* (6). Este ensaio não visa identificar mecanismos específicos de desregulação hormonal, pois os animais ensaiados possuem um eixo hipotálamo-hipófise-gónadas intacto e são passíveis de reagir a diversos níveis aos produtos químicos com efeitos nesse eixo. O Ensaio a curto prazo da Reprodução em Peixes (*Test Guideline* 229 da OCDE) inclui a fecundidade e a histopatologia das gónadas (no vairão-de-cabeça-gorda), assim como todos os parâmetros incluídos no presente método. O *Test Guideline* 229 da OCDE possibilita a despistagem dos produtos químicos que afetam a reprodução através de diversos mecanismos, nomeadamente de cariz endócrino. Há que ter estas diferenças em conta ao selecionar o método mais adequado.

2. Este método descreve um ensaio de despistagem *in vivo* que compreende a exposição de grupos mistos de machos sexualmente maduros e fêmeas reprodutoras ao produto químico durante um período limitado (21 dias) do ciclo de vida dos peixes utilizados. Ao terminar o período de 21 dias de exposição, consoante a espécie ensaiada, medem-se nos machos e fêmeas um ou dois parâmetros biomarcadores indicativos de atividade estrogénica, de inibição da aromatase ou androgénica do produto químico em estudo, designadamente a vitelogenina e caracteres sexuais secundários. Mede-se a vitelogenina no vairão-de-cabeça-gorda, no peixe-do-arroz-japonês e no peixe-zebra; medem-se os caracteres sexuais secundários no vairão-de-cabeça-gorda e no peixe-do-arroz-japonês.

3. Este bioensaio serve de ensaio de despistagem *in vivo* para determinados modos de ação no sistema endócrino, enquadrando-se a sua aplicação no contexto do *Quadro conceptual da OCDE para ensaio e avaliação de produtos químicos desreguladores do sistema endócrino* (28).

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES

4. As fêmeas de vertebrados ovíparos produzem normalmente vitelogenina como reação aos estrogénios endógenos em circulação. Trata-se se um precursor das proteínas do vitelo que, uma vez produzido no fígado, é transportado na corrente sanguínea até aos ovários, onde é absorvido e modificado pelos ovócitos em desenvolvimento. A vitelogenina é quase indetetável no plasma de peixes machos ou fêmeas imaturos, que não têm estrogénios suficientes em circulação. Porém, o fígado é capaz de sintetizar e segregar vitelogenina como reação a uma estimulação estrogénica exógena.

▼M6

5. A medição da vitelogenina serve para detetar produtos químicos com vários modos de ação estrogénica. É possível detetar produtos químicos estrogénicos medindo a indução de vitelogenina em peixes machos, método documentado em numerosas publicações científicas pré-avaliadas por especialistas — por exemplo (7). Também se demonstrou a indução de vitelogenina após exposição a androgénios aromatizáveis (8)(9). A diminuição do nível de estrogénios em circulação nas fêmeas, por exemplo através da inibição da aromatase, que converte o androgénio endógeno no estrogénio natural 17β-estradiol, provoca uma diminuição do nível de vitelogenina, efeito que é utilizado para detetar produtos químicos com propriedades inibidoras da aromatase (10)(11). As consequências biológicas de uma inibição estrogénica/da aromatase no nível de vitelogenina são um facto assente e estão amplamente documentadas. Todavia, a produção de vitelogenina nas fêmeas também pode ser afetada por toxicidade generalizada e por modos de ação tóxica não-endócrinos, por exemplo hepatotoxicidade.

6. Foram desenvolvidos e normalizados com êxito vários métodos de medição para ensaios de rotina. É o caso dos métodos ELISA específicos para uma determinada espécie que recorrem a processos imunoquímicos para quantificar a vitelogenina produzida em pequenas amostras hepáticas ou de sangue colhidas em peixes da espécie em causa (12)(13)(14)(15)(16)(17)(18). Para a medição da vitelogenina, colhem-se amostras de sangue (vairão-de-cabeça-gorda), de sangue ou de homogeneizado da cabeça e da cauda (peixe-zebra) ou do fígado (peixe-do-arroz-japonês). No peixe-do-arroz-japonês existe boa correlação entre a vitelogenina medida no sangue e no fígado (19). Descrevem-se no apêndice 6 os procedimentos recomendados para a colheita de amostras destinadas à análise da vitelogenina. É fácil encontrar *kits* para medição da vitelogenina, os quais, porém, devem basear-se num método ELISA validado para a espécie em causa.

7. Em determinadas espécies de peixes, os caracteres sexuais secundários dos machos são visíveis exteriormente, são quantificáveis e reagem aos níveis de androgénios endógenos em circulação. É o caso no vairão-de-cabeça-gorda e no peixe-do-arroz-japonês, mas não no peixe-zebra, que não possui caracteres sexuais secundários quantificáveis. As fêmeas conservam a capacidade de desenvolver caracteres sexuais secundários masculinos quando expostas a produtos químicos androgénicos na água. Estão disponíveis na literatura científica vários estudos que documentam este tipo de resposta no vairão-de-cabeça-gorda (20) e no peixe-do-arroz-japonês (21). Por razões de baixa representatividade estatística, um decréscimo dos caracteres sexuais secundários nos machos deve ser interpretado com precaução, com base na apreciação de especialistas na matéria e na ponderação da suficiência da prova. A utilização do peixe-zebra neste ensaio tem as suas limitações, por não existirem caracteres sexuais secundários quantificáveis que reagem a produtos químicos com atividade androgénica.

8. No vairão-de-cabeça-gorda, o principal indicador de exposição a androgénios exógenos é o número de tubérculos nupciais existentes no focinho das fêmeas. No peixe-do-arroz-japonês, é o número de processos papilares que constitui o principal marcador da exposição exógena de fêmeas a produtos químicos androgénicos. Descrevem-se nos apêndices 5A e 5B os procedimentos recomendados para avaliar caracteres sexuais no vairão-de-cabeça-gorda e no peixe-do-arroz-japonês.

9. No apêndice 1 definem-se alguns conceitos utilizados neste método.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

10. Expõem-se conjuntamente nas cubas de ensaio peixes machos e fêmeas em estádio reprodutor. Tratando-se de animais adultos reprodutores, é possível distinguir claramente um sexo do outro, o que possibilita uma análise em função do sexo de cada parâmetro, e garante-se a sensibilidade dos animais aos produtos químicos exógenos. No final do ensaio, confirma-se o sexo por exame macroscópico das gónadas, após incisão abdominal com uma tesoura. O apêndice 2 recapitula as condições experimentais relevantes do

▼M6

bioensaio. Normalmente inicia-se o ensaio com uma amostra de peixes de uma população de animais capazes de procriar. Não se utilizam peixes senescentes. O ponto que aborda adiante a seleção dos peixes dá indicações sobre a idade dos peixes e o estado reprodutivo dos mesmos. Realiza-se o ensaio com três concentrações de exposição ao produto químico em estudo, uma cuba de controlo da água e, se necessário, uma cuba de controlo do solvente. No caso do peixe-do-arroz-japonês e do peixe-zebra, utilizam-se duas cubas (replicados) por concentração de exposição (contendo cada cuba cinco machos e cinco fêmeas); no caso do vairão-de-cabeça-gorda, utilizam-se quatro cubas (replicados) por concentração de exposição (contendo cada cuba dois machos e quatro fêmeas). Tem-se, assim, em conta o comportamento territorial do vairão-de-cabeça-gorda macho, garantindo concomitantemente suficiente representatividade estatística do ensaio. A exposição prolonga-se por 21 dias, procedendo-se à colheita das amostras dos peixes ao vigésimo primeiro dia.

11. Todos os peixes são eutanasiados no vigésimo primeiro dia. Medem-se os caracteres sexuais secundários no vairão-de-cabeça-gorda e no peixe-do--arroz-japonês (ver os apêndices 5A e 5B). No caso do peixe-zebra e do vairão-de-cabeça-gorda, colhem-se amostras de sangue para determinação da vitelogenina; no caso do peixe-zebra, podem colher-se, em alternativa, amostras da cabeça e da cauda, para determinação da vitelogenina no correspondente homogeneizado (apêndice 6). No caso do peixe-do-arroz-japonês, colhem-se amostras do fígado para a análise da vitelogenina (apêndice 6).

CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO DO ENSAIO

12. Para que os resultados do ensaio possam considerar-se aceitáveis, têm de ser cumpridas as seguintes condições:

— mortalidade verificada nas cubas de controlo (água ou solvente), no final da exposição, não superior a 10 %;

— concentração de oxigénio dissolvido ao longo do período de exposição igual ou superior a 60 % do valor da saturação com ar (VSA);

— diferença de temperatura da água entre as diversas cubas de ensaio não superior a ±1,5 °C em qualquer momento do período de exposição, não se afastando a temperatura da água de cada cuba mais de 2 °C da temperatura especificada para a espécie utilizada no ensaio (apêndice 2);

— existência de dados demonstrativos de que a concentração em solução do produto químico em estudo se manteve satisfatoriamente num intervalo de ±20 % relativamente à média dos valores medidos.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Material e aparelhagem

13. Equipamento normal de laboratório, designadamente o seguinte:

a) Medidores de oxigénio e de pH;

b) Equipamento para determinação da alcalinidade e da dureza da água;

c) Aparelhagem apropriada para controlo da temperatura, de preferência com monitorização contínua;

d) Cubas de um material quimicamente inerte e de capacidade adequada à carga e à densidade de ocupação recomendadas (ver o apêndice 2);

e) Substrato de desova para o vairão-de-cabeça-gorda e o peixe-zebra (ver os pormenores necessários no apêndice 4);

f) Balança de precisão apropriada (isto é, com uma aproximação de ±0,5 mg).

▼M6

Água

14. Pode ser utilizada no ensaio qualquer água na qual a espécie em estudo apresente taxas adequadas de crescimento e de sobrevivência a longo prazo. A qualidade da água deve manter-se constante durante o ensaio. O pH da água deve situar-se entre 6,5 e 8,5, mas, durante um ensaio, não deve sofrer variações superiores a ±0,5 unidades de pH. Para assegurar que a água de diluição não influencia indevidamente os resultados do ensaio (por exemplo, por complexação do produto químico em estudo), devem ser colhidas regularmente amostras para análise. Deve determinar-se o teor de metais pesados (Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni etc.), dos principais aniões e catiões (Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, SO_4^{2-} etc.), de pesticidas (pesticidas organofosforados totais, pesticidas organoclorados totais etc.), de carbono orgânico total e de sólidos em suspensão. Se a qualidade da água de diluição se mantiver relativamente constante, estas medições podem realizar-se, por exemplo, de três em três meses. Caso se demonstre que a qualidade da água se mantém inalterada durante, pelo menos, um ano, estas determinações podem ser menos frequentes (de seis em seis meses, por exemplo). No apêndice 3 apresentam-se algumas características químicas de uma água de diluição aceitável.

Soluções utilizadas no ensaio

15. Preparam-se as soluções a utilizar no ensaio por diluição de uma solução de reserva. Preferencialmente, prepara-se a solução de reserva por simples mistura ou agitação do produto químico em estudo na água de diluição, utilizando meios mecânicos (agitação ou dispersão ultrassónica, por exemplo). Podem ser utilizadas colunas de saturação (colunas de solubilidade) para obter soluções de reserva de concentração adequada. Não se recomenda a utilização de solventes, mas, se for necessário um solvente, há que realizar em paralelo um ensaio deste, com a mesma concentração de solvente que nos casos da exposição ao produto químico em estudo. No caso dos produtos químicos difíceis de ensaiar, tecnicamente a melhor solução poderá ser o recurso a um solvente, devendo consultar-se o documento de orientações da OCDE sobre ensaios de toxicidade em meio aquático de substâncias e misturas difíceis (22). A escolha do solvente a utilizar depende das propriedades químicas do produto químico em causa. O documento de orientações da OCDE recomenda que não seja ultrapassada a concentração de 100 µl/l, o que deve ser respeitado. Importa, porém, referir que um estudo recente (23) veio acentuar as dúvidas acerca da utilização de solventes em ensaios de atividade endócrina. Por conseguinte, recomenda-se que se minimize, tanto quanto tecnicamente possível, a concentração do solvente que eventualmente seja necessário utilizar (a qual depende das propriedades físico-químicas do produto químico em estudo).

16. Os ensaios devem decorrer em fluxo contínuo. Neste sistema, tendo em vista a manutenção da série pretendida de concentrações nas cubas utilizadas no ensaio, é fornecida e diluída continuamente (por exemplo por meio de uma bomba doseadora, de um diluidor proporcional ou de um sistema saturador) uma solução de reserva do produto químico em estudo. Os caudais da solução de reserva e da água de diluição devem ser verificados regularmente durante o ensaio, de preferência diariamente, e não devem variar mais de 10 % ao longo do ensaio. Não deve utilizar-se tubagem de plástico de baixa qualidade ou outros materiais que possam conter produtos químicos biologicamente ativos. Ao selecionar o material para o sistema de fluxo contínuo, há que ter em conta a possibilidade de adsorção do produto químico em estudo ao material utilizado.

Aclimatação dos peixes

17. Selecionam-se os peixes a utilizar no ensaio a partir de uma população do laboratório (de preferência proveniente do mesmo lote) que tenha sido mantida durante, pelo menos, as duas semanas anteriores ao ensaio em condições de qualidade da água e de iluminação idênticas às que nele serão utilizadas. É importante que a taxa de carga e a densidade de ocupação (ver definições no apêndice 1) se adequem à espécie utilizada no ensaio (ver o apêndice 2).

18. Após um período de aclimatação de 48 horas, regista-se a mortalidade e aplicam-se os seguintes critérios:

▼M6

— mortalidade superior a 10 % da população num período de sete dias: rejeição da totalidade do lote;

— mortalidade de 5 % a 10 % da população: aclimatação durante um período adicional de sete dias: caso se verifique mortalidade superior a 5 % durante este segundo período de sete dias, rejeita-se a totalidade do lote;

— mortalidade inferior a 5 % da população num período de sete dias: aceitação do lote.

19. Durante o período de aclimatação, o período de pré-exposição e o período de exposição não é ministrado aos peixes nenhum tratamento contra doenças.

Pré-exposição e seleção dos peixes

20. Recomenda-se um período de pré-exposição de uma semana, durante o qual os peixes são mantidos em cubas semelhantes às que serão utilizadas no ensaio. Durante o período de aclimatação e na fase de exposição, os peixes devem ser alimentados *ad libitum*. Inicia-se a fase de exposição utilizando peixes adultos com dimorfismo sexual provenientes de uma população do laboratório de peixes sexualmente maduros (que apresentem, por exemplo caracteres sexuais secundários claramente visíveis, no caso do vairão-de-cabeça-gorda e do peixe-do-arroz-japonês) e efetivamente em procriação. Como orientação geral unicamente (que não deve ser seguida sem ser complementada pela observação do estado reprodutivo real do lote de peixes em causa), os vairões-de-cabeça-gorda devem ter cerca de 20 (±2) semanas de idade, admitindo que foram mantidos a 25±2 °C durante todo o seu tempo de vida; os peixes-do-arroz-japoneses devem ter cerca de 16 (±2) semanas de idade, admitindo que foram mantidos a 25±2 °C durante todo o seu tempo de vida; os peixes-zebra devem ter cerca de 16 (±2) semanas de idade, admitindo que foram mantidos a 26±2 °C durante todo o seu tempo de vida.

PLANEAMENTO DO ENSAIO

21. Utilizam-se três concentrações do produto químico em estudo, uma cuba de controlo da água e, se necessário, uma cuba de controlo do solvente. É necessário analisar os dados para determinar eventuais diferenças com significância estatística entre as reações verificadas nas cubas expostas ao produto químico em estudo e na(s) cuba(s) de controlo. Mais do que servirem para a avaliação dos riscos, essas análises são úteis para determinar se é necessário pesquisar efeitos indesejados (ao nível da sobrevivência, do desenvolvimento, do crescimento e da reprodução) do produto químico em estudo através de ensaios mais longos (24).

22. No caso do peixe-zebra e do peixe-do-arroz-japonês, recolhem-se amostras no 21.º dia do ensaio dos machos e fêmeas expostos a cada nível de concentração (5 machos e 5 fêmeas de cada duplicado) e da(s) cuba(s) de controlo, para determinação da vitelogenina e, se for caso disso, dos caracteres sexuais secundários. No caso do vairão-de-cabeça-gorda, recolhem-se amostras no 21.º dia de exposição dos machos e fêmeas expostos a cada nível de concentração (2 machos e 4 fêmeas de cada quadruplicado) e da(s) cuba(s) de controlo, para determinação da vitelogenina e dos caracteres sexuais secundários.

Escolha das concentrações a utilizar no ensaio

23. A concentração mais elevada a utilizar neste ensaio é a mais baixa das seguintes concentrações: concentração máxima tolerada (CMT), obtida num ensaio preliminar de determinação da gama de concentrações a utilizar ou a partir de outros dados de toxicidade; 10 mg/l; solubilidade máxima em água. Define-se a concentração máxima tolerada como a concentração mais elevada do produto químico em estudo que, quando ensaiada, gera menos de 10 % de mortalidade. Esta abordagem pressupõe a existência de dados empíricos de toxicidade aguda ou outros dados de toxicidade a partir dos quais se pode estimar a concentração máxima tolerada. A estimativa da concentração máxima tolerada pode ser inexata e, normalmente, requer uma certa capacidade de apreciação na matéria.

▼M6

24. Utilizam-se no ensaio três concentrações do produto químico em estudo, intervaladas por um fator constante não superior a 10, uma cuba de controlo da água de diluição e, se necessário, uma cuba de controlo do solvente. Recomenda-se que o fator que define o intervalo entre concentrações se situe entre 3,2 e 10.

PROCEDIMENTO DE ENSAIO

Seleção e pesagem dos peixes a utilizar no ensaio

25. É importante minimizar a variabilidade dos pesos dos peixes no início do ensaio. Indicam-se no apêndice 2 as gamas de pesos adequadas recomendadas para as várias espécies neste ensaio. Se possível, no início do ensaio, o peso de cada peixe macho e de cada peixe fêmea que constituem os peixes utilizados no ensaio não deve afastar-se mais de 20 % da média aritmética dos pesos do sexo correspondente. A fim de estimar o peso médio, recomenda-se a pesagem de uma subamostra do lote de peixes antes de iniciar o ensaio.

Condições de exposição

Duração

26. O ensaio prolonga-se por 21 dias, após um período de pré-exposição. Recomenda-se que este último tenha a duração de uma semana.

Alimentação

27. Fornece-se aos peixes, *ad libitum*, uma alimentação adequada (apêndice 2), em quantidade e com frequência suficientes para os manter em boas condições físicas. Devem ser tomadas as precauções necessárias para evitar a proliferação de microrganismos e a turvação da água. Como indicação geral, a ração diária, em vez de ser fornecida de uma só vez, pode ser dividida em duas ou três doses iguais, a serem fornecidas com, pelo menos, três horas de intervalo. É aceitável uma dose única maior, nomeadamente nos fins de semana. Não se fornecem alimentos aos peixes nas doze horas que antecedem a colheita de amostras/a necropsia.

28. É necessário verificar se, nos alimentos fornecidos aos peixes, estão presentes contaminantes como pesticidas organoclorados, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e bifenilos policlorados. Importa não utilizar alimentos com teor elevado de fitoestrogénios, que comprometeriam a reação obtida no ensaio a um agonista de estrogénios conhecido (por exemplo, o 17beta-estradiol).

29. Removem-se os alimentos não ingeridos e as matérias fecais das cubas de ensaio pelo menos duas vezes por semana, por exemplo limpando cuidadosamente o fundo de cada cuba com um sifão.

Luz e temperatura

30. O fotoperíodo e a temperatura da água devem ser adequados à espécie utilizada no ensaio (ver o apêndice 2).

Frequência das medições e das determinações analíticas

31. Antes de iniciar o período de exposição, é necessário verificar se o sistema de distribuição do produto químico está a funcionar bem. Todos os métodos analíticos necessários devem estar bem estabelecidos, incluindo um conhecimento suficiente da estabilidade do produto químico estudo no sistema de ensaio. Durante o ensaio, determinam-se as concentrações do produto químico em estudo a intervalos regulares, do seguinte modo: de preferência diariamente, mas, pelo menos, duas vezes por semana, verificam-se os caudais do diluente e da solução de reserva do produto químico tóxico, os quais não devem variar mais de 10 % ao longo do ensaio. Recomenda-se a medição das concentrações reais do produto químico em estudo, em todas as cubas, no início do ensaio e, em seguida, semanalmente.

32. Recomenda-se que os resultados se baseiem em concentrações medidas. Todavia, se, durante todo o ensaio, as concentrações em solução do produto químico em estudo não se tiverem desviado mais de 20 % das concentrações nominais, os resultados podem basear-se nos valores nominais ou nos valores medidos.

33. As amostras podem precisar de ser centrifugadas ou filtradas (utilizando filtros com porosidade de 0,45 μm, por exemplo). Se for necessária uma destas operações, recomenda-se a centrifugação. No entanto, se o produto químico em estudo não se adsorver ao filtro, também é aceitável a filtração.

▼M6

34. Durante o ensaio, mede-se, pelo menos, uma vez por semana o oxigénio dissolvido, a temperatura e o pH de cada cuba. Pelo menos uma vez por semana, medem-se a alcalinidade e a dureza total na(s) cuba(s) de controlo e numa das cubas com a concentração mais elevada. De preferência, monitoriza-se a temperatura continuamente em, pelo menos, um recipiente de ensaio.

Exames

35. Avaliam-se uma série de reações biológicas genéricas (por exemplo a sobrevivência) e específicas (por exemplo os níveis de vitelogenina) durante o ensaio e no termo do mesmo. Descreve-se a seguir o modo de medição e de avaliação desses parâmetros e a utilidade dos mesmos.

Sobrevivência

36. Examinam-se diariamente os peixes ao longo do ensaio, registam-se os casos de mortalidade e retiram-se os peixes mortos o mais rapidamente possível. Os peixes mortos em qualquer das cubas não são substituídos. Determina-se o sexo dos peixes que morrerem durante o ensaio, por observação macroscópica das gónadas.

Comportamento e aspeto

37. Registam-se todos os comportamentos anormais (relativamente aos peixes de controlo), nomeadamente sinais de toxicidade generalizada como hiperventilação, natação descoordenada, perda de equilíbrio e alimentação ou inatividade atípicas. Registam-se igualmente as anomalias externas (tais como hemorragias e descoloração). Estes sinais de toxicidade devem ser cuidadosamente tidos em conta na interpretação dos dados, pois podem indiciar concentrações às quais os biomarcadores de atividade endócrina não são fiáveis. Estes exames comportamentais também podem fornecer informações qualitativas úteis que permitam justificar futuramente determinadas exigências nos ensaios com peixes. Por exemplo, observou-se agressividade territorial em machos normais ou fêmeas masculinizadas de vairões-de-cabeça-gorda expostos a androgénios; em peixes-zebra expostos a estrogénios ou a antiandrogénios, verificou-se uma redução ou perturbação do comportamento de acasalamento e de desova característico após a alvorada.

38. Dado que a manipulação dos peixes pode modificar rapidamente determinadas características do aspeto dos mesmos (nomeadamente a cor), é importante que os exames qualitativos sejam realizados antes de retirar os animais do sistema de ensaio. A experiência recolhida até à data com vairões-de-cabeça-gorda aponta para que alguns produtos químicos com atividade endócrina podem começar por induzir alterações das seguintes características externas: cor do corpo (clara ou escura), padrões de coloração (ocorrência de bandas verticais) e forma do corpo (cabeça e região peitoral). Por conseguinte, o aspeto físico dos peixes deve ser examinado ao longo do ensaio e no termo do estudo.

Eutanásia dos peixes

39. No 21.º dia, ou seja, no final da exposição, eutanasiam-se os peixes com quantidades adequadas de tricaína — solução 100-500 mg/l de metanossulfonato de tricaína (metacaína, MS-222, CAS 886-86-2), tamponada com solução 300 mg/l de $NaHCO_3$ (bicarbonato de sódio, CAS 144-55-8) –, para reduzir a irritação das mucosas. Em seguida, colhem-se amostras de sangue ou de tecidos para determinação da vitelogenina, como se explica no item correspondente.

▼M6

Exame de caracteres sexuais secundários

40. Alguns produtos químicos com atividade endócrina podem induzir alterações em caracteres sexuais secundários especializados (número de tubérculos nupciais no vairão-de-cabeça-gorda, processos papilares no peixe-do-arroz-japonês macho). Determinados produtos químicos com determinados modos de ação podem, nomeadamente, ser responsáveis pela ocorrência anormal de caracteres sexuais secundários em animais do sexo oposto. Por exemplo, agonistas dos recetores de androgénios, como a trembolona, a metiltestosterona e a di-hidro-testosterona, podem provocar o aparecimento de tubérculos nupciais pronunciados no vairão-de-cabeça-gorda fêmea ou de processos papilares no peixe-do-arroz-japonês fêmea (11)(20)(21). Também há registo de que os agonistas dos recetores de estrogénios podem reduzir o número de tubérculos nupciais e o volume da massa adiposa dorsal situada na base da cabeça dos machos adultos (25)(26). Estes exames morfológicos macroscópicos podem fornecer informações qualitativas e quantitativas úteis que permitam justificar futuramente determinadas exigências nos ensaios com peixes. O número e a dimensão dos tubérculos nupciais no vairão-de-cabeça-gorda e dos processos papilares no peixe-do-arroz-japonês podem ser imediatamente quantificados ou — o que é mais prático — sê-lo em espécimes conservados. Nos apêndices 5A e 5B recomendam-se procedimentos para a avaliação dos caracteres sexuais secundários respetivamente do vairão-de-cabeça-gorda e do peixe-do-arroz-japonês.

Vitelogenina (VTG)

41. Colhe-se uma amostra de sangue na artéria/veia caudal com um microtubo capilar heparinizado para determinação do hematócrito ou, em alternativa, por punção cardíaca com uma seringa. O volume de sangue colhido depende do tamanho do peixe e geralmente situa-se entre 5 µl e 60 µl por peixe no caso do vairão-de-cabeça-gorda e entre 5 µl e 15 µl por peixe no caso do peixe-do-arroz-japonês. Separa-se o plasma do resto do sangue por centrifugação e armazena-se a – 80 °C com inibidores das proteases, até à determinação analítica da vitelogenina. Em alternativa, como fonte de tecidos para determinação da vitelogenina, pode utilizar-se o fígado no caso do peixe-do-arroz-japonês e homogeneizado da cabeça e da cauda no caso do peixe-zebra (apêndice 6). A determinação da vitelogenina é efetuada por um método ELISA homólogo validado, utilizando anticorpos homólogos e um padrão homólogo de vitelogenina. Recomenda-se o recurso a um método que permita detetar níveis de vitelogenina da ordem de alguns nanogramas por mililitro de plasma (ou nanogramas por miligrama de tecido), correspondentes ao nível de fundo dos peixes machos não-expostos.

42. O controlo de qualidade da análise da vitelogenina assenta na utilização de padrões, brancos e, pelo menos, duplicados. É necessário realizar um ensaio do efeito da matriz (efeito da diluição da amostra) em cada método ELISA, a fim de determinar o fator de diluição mínimo das amostras. Cada placa utilizada num método ELISA para determinação da vitelogenina deve incluir as seguintes amostras de controlo da qualidade: pelo menos 6 padrões de calibração que cubram o intervalo das concentrações previstas de vitelogenina e, pelo menos, um branco de ligações inespecíficas (analisado em duplicado). A absorvância destes brancos deve ser inferior a 5 % da absorvância máxima dos padrões de calibração. Analisam-se, pelo menos, duas alíquotas (alvéolos duplicados) de cada diluição da amostra. Reanalisam-se os alvéolos duplicados cujos resultados difiram mais de 20 %.

43. O coeficiente de correlação (R^2) das curvas de calibração deve ser superior a 0,99. Todavia, uma correlação elevada não é, por si só, garantia suficiente de capacidade de previsão adequada da concentração em toda a gama de concentrações. Além da correlação suficientemente elevada da curva de calibração, é necessário que a concentração de cada padrão, calculada a partir da curva de calibração, se situe entre 70 % e 120 % da concentração nominal correspondente. Se as concentrações nominais evidenciarem uma tendência de afastamento da reta de regressão de calibração (por exemplo a

▼M6

baixas concentrações), pode ser necessário dividir a curva de calibração numa gama alta e numa gama baixa ou recorrer a um modelo não linear que se ajuste adequadamente aos dados de absorvância. Se a curva for dividida, é necessário que, em ambos os segmentos de reta, $R^2 > 0,99$.

44. Define-se «limite de deteção» como a concentração do padrão analítico de concentração mais baixa e «limite de quantificação» como a concentração do padrão analítico de concentração mais baixa, multiplicada pelo fator de diluição mais baixo.

45. Em cada dia em que se realizem determinações da vitelogenina, analisa-se uma amostra enriquecida com um padrão de referência interno (apêndice 7). Juntamente com os resultados de cada série de ensaios realizados no dia, indica-se no relatório a relação entre a concentração esperada e a concentração medida.

DADOS E RELATÓRIOS

Avaliação das reações dos biomarcadores por análise da variância (ANOVA)

46. A fim de identificar a atividade endócrina potencial do produto químico em estudo, comparam-se as reações obtidas para os grupos expostos e para os grupos de controlo por meio de uma análise de variância (ANOVA). Caso se utilize uma cuba de controlo do solvente, é necessário efetuar, para cada parâmetro, um teste estatístico adequado de comparação entre a cuba de controlo da água de diluição e a cuba de controlo do solvente. A referência (27) [OCDE (2006c)] fornece orientações sobre o tratamento de análise estatística a dar aos dados relativos à cuba de controlo da água de diluição e à cuba de controlo do solvente. Os dados relativos às reações biológicas analisam-se e apresentam-se no relatório separadamente por sexo. Se as exigências dos métodos paramétricos não forem satisfeitas — distribuição não-normal (teste de Shapiro-Wilk, por exemplo) ou variância heterogénea (teste de Bartlett ou teste de Levene) –, deve equacionar-se a possibilidade de proceder a uma transformação dos dados, para homogeneizar as variâncias antes da análise de variância, ou de optar por uma análise de variância ponderada. Se a relação entre a dose fornecida e a reação obtida não for monótona, pode aplicar-se o teste (paramétrico) de Dunnett a múltiplas comparações par a par ou recorrer-se ao teste (não-paramétrico) de Mann-Whitney com ajustamento de Bonferroni. Se a relação entre a dose fornecida e a reação obtida for aproximadamente monótona, pode recorrer-se a outros testes, por exemplo o teste de Jonckheere-Terpstra ou o teste de Williams. O fluxograma do apêndice 8 visa facilitar a escolha do teste estatístico mais adequado. O documento da OCDE sobre as abordagens atuais na análise estatística de dados de ecotoxicidade (27) contém informações complementares.

Relatório dos resultados do ensaio

47. Dados do estudo a fornecer:

Instalações nas quais se realizaram os ensaios

— pessoal responsável e responsabilidades de cada um no estudo;

— competência técnica do laboratório, previamente demonstrada para uma gama de produtos químicos representativos.

Produto químico em estudo

— caracterização do produto químico;

— estado físico e propriedades físico-químicas pertinentes;

▼**M6**

— método e frequência de preparação das concentrações utilizadas no ensaio;

— informações sobre estabilidade e biodegradabilidade.

Solvente

— caracterização do solvente (natureza, concentração utilizada);

— justificação da escolha do solvente (se não for água).

Animais utilizados no ensaio

— espécie e estirpe;

— fornecedor e instalações específicas do fornecedor;

— idade dos peixes no início do ensaio e estado reprodutivo/de procriação dos peixes;

— elementos relativos ao processo de aclimatação dos peixes;

— peso corporal dos peixes no início da exposição (determinado a partir de uma subamostra do lote de peixes).

Condições de realização do ensaio

— protocolo experimental utilizado (tipo de ensaio, taxa de carga, densidade de ocupação etc.);

— método de preparação das soluções de reserva e caudal;

— concentrações de ensaio nominais, concentrações medidas semanalmente das soluções utilizadas no ensaio e métodos analíticos utilizados para isso, médias dos valores medidos nas cubas e desvios-padrão correspondentes e elementos comprovativos de que as medições dizem respeito às concentrações reais em solução do produto químico em estudo;

— características da água de diluição (pH, dureza, alcalinidade, temperatura, concentração de oxigénio dissolvido, níveis de cloro residuais, carbono orgânico total, sólidos em suspensão e outras medições efetuadas);

— qualidade da água nas cubas de ensaio: pH, dureza, temperatura e concentração de oxigénio dissolvido;

— informações pormenorizadas sobre a alimentação dos peixes — por exemplo, tipo(s) de alimento, proveniência do(s) mesmo(s), quantidade e frequência do fornecimento de alimento e resultados das análises de contaminantes relevantes (por exemplo, bifenilos policlorados, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e pesticidas organoclorados), se disponíveis.

Resultados

— elementos comprovativos de que as cubas de controlo respeitaram os critérios de aceitação do ensaio;

— dados relativos à mortalidade ocorrida para cada concentração ensaiada e nas cubas de controlo;

— técnicas de análise estatística utilizadas, tratamento dos dados e justificação das técnicas utilizadas;

— dados relativos ao exame biológico da morfologia macroscópica, incluindo os caracteres sexuais secundários, e à vitelogenina;

▼M6

— resultados das análises dos dados, de preferência reunidos em quadros e sob a forma de gráficos;

— incidência de quaisquer reações inabituais manifestadas pelos peixes e de quaisquer efeitos visíveis do produto químico em estudo.

ORIENTAÇÕES PARA INTERPRETAÇÃO E ACEITAÇÃO DOS RESULTADOS DO ENSAIO

48. Nesta secção reflete-se sobre a interpretação dos resultados obtidos no ensaio para os diversos parâmetros medidos. Se o produto químico em estudo parecer ter efeitos tóxicos manifestos ou influenciar o estado geral dos animais ensaiados, os resultados obtidos devem ser interpretados com precaução.

49. Ao escolher a gama de concentrações a utilizar num ensaio, não deve exceder-se a concentração máxima tolerada, a fim de possibilitar uma interpretação com significado dos dados. É importante que, pelo menos, uma das concentrações de exposição não gere sinais de efeitos tóxicos. Os sintomas de doenças e os sinais de efeitos tóxicos devem ser cuidadosamente avaliados e descritos no relatório. Por exemplo, a produção de vitelogenina nas fêmeas também pode ser influenciada por toxicidade generalizada e por modos de ação tóxica não-endócrinos, caso da hepatotoxicidade. Porém, a interpretação dos efeitos pode ser facilitada por outros níveis de exposição, cujos efeitos não sejam perturbados por toxicidade sistémica.

50. Há vários aspetos a ponderar na aceitação dos resultados de um ensaio. Como orientação, os níveis de vitelogenina de machos e fêmeas nos grupos de controlo devem diferir entre si, pelo menos, de três ordens de grandeza, no caso do vairão-de-cabeça-gorda e do peixe-zebra, e cerca de uma ordem de grandeza, no caso do peixe-do-arroz-japonês. Os relatórios de validação (1)(2)(3)(4) apresentam exemplos de valores determinados em grupos de controlo e grupos expostos. Se os machos de controlo apresentarem valores de vitelogenina elevados, podem ficar comprometidas a sensibilidade do ensaio e a capacidade de deteção de agonistas fracos de estrogénios. Se as fêmeas de controlo apresentarem valores de vitelogenina baixos, podem ficar comprometidas a sensibilidade do ensaio e a capacidade de deteção de inibidores da aromatase e de antagonistas de estrogénios. Estas orientações baseiam-se nos estudos de validação.

51. Se o laboratório nunca tiver realizado este ensaio ou se tiverem sido efetuadas alterações substanciais (mudança do fornecedor ou da estirpe dos peixes, por exemplo), é aconselhável realizar um estudo de competência técnica. Nesse caso, recomenda-se que o estudo abranja produtos químicos que cubram diversos modos de ação ou efeitos em vários dos parâmetros avaliados no ensaio. Na prática, incentiva-se cada laboratório a constituir um registo de dados históricos de controlo de machos e fêmeas e a realizar um ensaio de controlo positivo de um produto químico com atividade estrogénica (por exemplo 17β-estradiol a 100 ng/l ou um agonista fraco conhecido) que aumente o nível de vitelogenina nos peixes machos, um ensaio de controlo positivo da inibição da aromatase (por exemplo fadrozole ou procloraz a 300 μg/l) que diminua a vitelogenina nos peixes fêmeas e um ensaio de controlo positivo de um produto químico com atividade androgénica (por exemplo 17β-trembolona a 5 μg/l) que induza caracteres sexuais secundários no vairão-de-cabeça-gorda e no peixe-do-arroz-japonês fêmeas. Para ajuizar da competência do laboratório, comparam-se os dados assim obtidos com os dados provenientes dos estudos de validação (1)(2)(3).

52. Em geral, na ausência de sinais de toxicidade generalizada, considera-se positivo um resultado obtido em medições de vitelogenina caso se verifique um aumento com significância estatística da vitelogenina nos machos ($p<0,05$) ou uma diminuição com significância estatística da vitelogenina nas fêmeas ($p<0,05$), pelo menos para a maior dose ensaiada, comparativamente ao grupo de controlo. Corrobora ainda um resultado positivo a demonstração de uma relação biologicamente plausível entre a dose e a curva de resposta às doses. Como já se referiu, a diminuição do nível de vitelogenina pode não ser de origem totalmente endócrina. Porém, um resultado positivo deve, geralmente, ser interpretado como prova de atividade endócrina *in vivo* e, normalmente, deve dar lugar a uma pesquisa mais aprofundada.

▼**M6**

REFERÊNCIAS

1) OCDE (2006a). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1A). OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, No. 60, ENV/JM/MONO(2006)27.

2) OCDE (2006b). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1 B). OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, No. 61, ENV/JM/MONO(2006)29.

3) OCDE (2007). Final report of the Validation of the 21-day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine Active Substances. Phase 2: Testing Negative Substances. OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, No. 78, ENV/JM/MONO(2007)25.

4) Owens, J.W. (2007). Phase 3 report of the validation of the OECD Fish Screening Assay. CEFIC LRI Project, Endocrine (http://www.cefic-lri.org/index.php?page=projects — acesso em 18/9/2008).

5) US EPA (2007). Validation of the Fish Short-Term Reproduction Assay: Integrated Summary Report. Relatório não publicado, datado de 15 de dezembro de 2007. US Environmental Protection Agency, Washington, DC. 104 pp.

6) OCDE 2008. Report of the Validation Peer Review for the 21-Day Fish Endocrine Screening Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, No. 94, ENV/JM/MONO(2008)21.

7) Sumpter, Jobling (1995). Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environmental Health Perspectives*, 103 Suppl. 7:173-8 Review.

8) Pawlowski, S., Sauer, A., Shears, J.A., Tyler, C.R., Braunbeck, T. (2004). Androgenic and estrogenic effects of the synthetic androgen 17alpha-methyltestosterone on sexual development and reproductive performance in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) determined using the gonadal recrudescence assay. *Aquatic Toxicology*, 68(3):277-91.

9) Andersen, L., Goto-Kazato, R., Trant, J.M., Nash, J.P., Korsgaard, B., Bjerregaard, P. (2006). Short-term exposure to low concentrations of the synthetic androgen methyltestosterone affects vitellogenin and steroid levels in adult male zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*, 76(3-4):343-52.

10) Ankley, G.T., Kahl, M.D., Jensen, K.M., Hornung, M.W., Korte, J.J., Makynen, E.A., Leino, R.L. (2002). Evaluation of the aromatase inhibitor fadrozole in a short-term reproduction assay with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Toxicological Sciences*, 67(1):121-30.

11) Panter, G.H., Hutchinson, T.H., Hurd, K.S., Sherren, A., Stanley, R.D., Tyler, C.R. (2004). Successful detection of (anti-)androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (*Pimephales promelas*) using easily measured endpoints of sexual development. *Aquatic Toxicology*, 70(1):11-21.

12) Parks, L.G., Cheek, A.O., Denslow, N.D., Heppell, S.A., McLachlan, J.A., LeBlanc, G.A., Sullivan, C.V. (1999). Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. *Comparative Biochemistry and Physiology.* Part C: Pharmacology, toxicology and endocrinology, 123(2):113-25.

▼**M6**

13) Panter, G.H., Tyler, C.R., Maddix, S., Campbell, P.M., Hutchinson, T.H., Länge, R., Lye, C., Sumpter, J.P. (1999). Application of an ELISA to quantify vitellogenin concentrations in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to endocrine disrupting chemicals. CEFIC-EMSG research report reference AQ001. CEFIC, Bruxelas, Bélgica.

14) Fenske, M., van Aerle, R.B., Brack, S.C., Tyler, C.R., Segner, H. (2001). Development and validation of a homologous zebrafish (*Danio rerio* Hamilton-Buchanan) vitellogenin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its application for studies on estrogenic chemicals. *Comp. Biochem. Phys.*, C 129 (3):217-232.

15) Holbech, H., Andersen, L., Petersen, G.I., Korsgaard, B., Pedersen, K.L., Bjerregaard, P. (2001). Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology.* Part C: Pharmacology, toxicology and endocrinology, 130:119-131.

16) Rose, J., Holbech, H., Lindholst, C., Noerum, U., Povlsen, A., Korsgaard, B., Bjerregaard, P. (2002). Vitellogenin induction by 17ß-estradiol and 17ß--ethinylestradiol in male zebrafish (*Danio rerio*). *Comp. Biochem. Physiol.*, C, 131:531-539.

17) Brion, F., Nilsen, B.M., Eidem, J.K., Goksoyr, A., Porcher, J.M. Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 21:1699-1708.

18) Yokota, H., Morita, H., Nakano, N., Kang, I.J., Tadokoro, H., Oshima, Y., Honjo, T., Kobayashi, K. (2001). Development of an ELISA for determination of the hepatic vitellogenin in Medaka (*Oryzias latipes*). *Jpn. J. Environ. Toxicol.*, 4:87–98.

19) Tatarazako, N., Koshio, M., Hori, H., Morita, M., Iguchi, T. (2004). Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the Medaka. *Journal of Health Science*, 50:301-308.

20) Ankley, G.T., Jensen, K.M., Makynen, E.A., Kahl, M.D., Korte, J.J., Homung, M.W., Henry, T.R., Denny, J.S., Leino, R.L., Wilson, V.S., Cardon, M.C., Hartig, P.C., Gray, L.E. (2003). Effects of the androgenic growth promoter 17-beta-trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22(6):1350-60.

21) Seki, M., Yokota, H., Matsubara, H., Maeda, M., Tadokoro, H., Kobayashi, K. (2004). Fish full life-cycle testing for androgen methyltestosterone on medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(3):774-81.

22) OCDE 2000: Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, No. 23. Paris.

23) Hutchinson, T.H., Shillabeer, N., Winter, M.J., Pickford, D.B. (2006a). Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. Review. *Aquatic Toxicology*, 76; pp. 69-92.

24) Hutchinson, T.H., Ankley, G.T., Segner, H., Tyler, C.R. (2006b). Screening and testing for endocrine disruption in fish-biomarkers as «signposts», not «traffic lights», in risk assessment. *Environmental Health Perspectives*, 114 Suppl. 1:106-14.

25) Miles-Richardson, S.R., Kramer, V.J., Fitzgerald, S.D., Render, J.A., Yamini, B., Barbee, S.J., Giesy, J.P. (1999). Effects of waterborne exposure to 17B-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Aquat. Toxicol.*, 47, 129-145.

▼**M6**

26) Martinovic, D., Blake, L.S., Durhan, E.J., Greene, K.J., Kahl, M.D., Jensen, K.M., Makynen, E.A., Villeneuve, D.L., Ankley, G.T. (2008). Characterization of reproductive toxicity of vinclozolin in the fathead minnow and co-treatment with an androgen to confirm an anti-androgenic mode of action. *Environ. Toxicol. Chem.*, 27, 478-488.

27) OCDE (2006c). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, No. 54. ENV/JM/ /MONO(2006)18.

28) OCDE (2012). OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters (revised). Annex I to Draft Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Series on Testing and Assessment, No. 150. ENV/JM/MONO(2012)22.

▼M6

Apêndice 1

Abreviaturas e definições

Produto químico: Substância ou mistura.

CV: Coeficiente de variação.

ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay***):** Ensaio de imunossorção com ligação enzimática.

Taxa de carga: Peso húmido de peixe por volume de água.

Densidade de ocupação: Número de peixes por volume de água.

Vitelogenina (VTG): Fosfolipoglicoproteína precursora das proteínas do vitelo que normalmente ocorre nas fêmeas sexualmente ativas de todas as espécies ovíparas.

Eixo HHG: Eixo hipotálamo-hipófise-gónadas.

CMT: Concentração máxima tolerada; representa cerca de 10 % da CL_{50}.

Produto químico em estudo: Qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado este método de ensaio.

▼M6

Apêndice 2

Condições experimentais do ensaio de despistagem de atividade endócrina em peixes

1. Espécies recomendadas	**Vairão-de-cabeça-gorda** (*Pimephales promelas*)	**Peixe-do-arroz-japonês** (*Oryzias latipes*)	**Peixe-zebra** (*Danio rerio*)
2. Tipo de ensaio	Fluxo contínuo	Fluxo contínuo	Fluxo contínuo
3. Temperatura da água	25 ± 2 °C	25 ± 2 °C	26 ± 2 °C
4. Iluminação	Lâmpadas fluorescentes (espetro largo)	Lâmpadas fluorescentes (espetro largo)	Lâmpadas fluorescentes (espetro largo)
5. Intensidade luminosa	10-20 $\mu E/m^2/s$, 540-1 000 lux ou 50-100 ft-c (níveis ambientes no laboratório)	10-20 $\mu E/m^2/s$, 540-1 000 lux ou 50-100 ft-c (níveis ambientes no laboratório)	10-20 $\mu E/m^2/s$, 540-1 000 lux ou 50-100 ft-c (níveis ambientes no laboratório)
6. Fotoperíodo (as transições alvorada e crepúsculo não são consideradas necessárias e são facultativas)	16 horas de luz seguidas de 8 horas de escuridão	12-16 horas de luz seguidas de 12-8 horas de escuridão	12-16 horas de luz seguidas de 12-8 horas de escuridão
7. Taxa de carga	<5 g por litro	<5 g por litro	<5 g por litro
8. Volume de cada cuba	10 l (mínimo)	2 l (mínimo)	5 l (mínimo)
9. Volume de solução em cada cuba	8 l (mínimo)	1,5 l (mínimo)	4 l (mínimo)
10. Substituição total do volume de solução em cada cuba	Mínimo 6 diárias	Mínimo 5 diárias	Mínimo 5 diárias
11. Idade dos organismos utilizados no ensaio	Ver o ponto 20.	Ver o ponto 20.	Ver o ponto 20.
12. Peso húmido aproximado de um peixe adulto (g)	Fêmeas: 1,5 ± 20 % Machos: 2,5 ± 20 %	Fêmeas: 0,35 ± 20 % Machos: 0,35 ± 20 %	Fêmeas: 0,65 ± 20 % Machos: 0,4 ± 20 %
13. Número de peixes por cuba	6 (2 machos e 4 fêmeas)	10 (5 machos e 5 fêmeas)	10 (5 machos e 5 fêmeas)
14. Número de concentrações de exposição	3 (mais as cubas de controlo adequadas)	3 (mais as cubas de controlo adequadas)	3 (mais as cubas de controlo adequadas)
15. Número de cubas por concentração de exposição	Mínimo 4	Mínimo 2	Mínimo 2
16. Número de peixes por concentração ensaiada	16 fêmeas adultas e 8 machos adultos (4 fêmeas e 2 machos em cada cuba replicada)	10 fêmeas adultas e 10 machos adultos (5 fêmeas e 5 machos em cada cuba replicada)	10 fêmeas adultas e 10 machos adultos (5 fêmeas e 5 machos em cada cuba replicada)
17. Alimentação	Artémias adultas ou náuplios de artémias, vivos ou congelados, duas ou três vezes por dia (*ad libitum*), alimento para peixes disponível no comércio ou uma combinação dos dois	Náuplios de artémias duas ou três vezes por dia (*ad libitum*), alimento para peixes disponível no comércio ou uma combinação dos dois	Náuplios de artémias duas ou três vezes por dia (*ad libitum*), alimento para peixes disponível no comércio ou uma combinação dos dois

▼M6

18. Arejamento	Nenhum, salvo se a concentração de oxigénio dissolvido descer abaixo de 60 % do valor da saturação com ar	Nenhum, salvo se a concentração de oxigénio dissolvido descer abaixo de 60 % do valor da saturação com ar	Nenhum, salvo se a concentração de oxigénio dissolvido descer abaixo de 60 % do valor da saturação com ar
19. Água de diluição	Água de superfície, de poço ou reconstituída, ou água da torneira desclorada, limpa	Água de superfície, de poço ou reconstituída, ou água da torneira desclorada, limpa	Água de superfície, de poço ou reconstituída, ou água da torneira desclorada, limpa
20. Período de pré-exposição	7 dias (recomendado)	7 dias (recomendado)	7 dias (recomendado)
21. Duração da exposição ao produto químico	21 dias	21 dias	21 dias
22. Parâmetros biológicos	sobrevivência comportamento caracteres sexuais secundários vitelogenina	sobrevivência comportamento caracteres sexuais secundários vitelogenina	sobrevivência comportamento vitelogenina
23. Aceitabilidade do ensaio	concentração de oxigénio dissolvido >60 % do valor de saturação; temperatura média de 25 ± 2 °C; 90 % de peixes sobreviventes nas cubas de controlo; concentrações medidas no ensaio situadas num intervalo de ±20 % relativamente à média dos valores medidos para cada nível de exposição.	concentração de oxigénio dissolvido >60 % do valor de saturação; temperatura média de 24 ± 2 °C; 90 % de peixes sobreviventes nas cubas de controlo; concentrações medidas no ensaio situadas num intervalo de ±20 % relativamente à média dos valores medidos para cada nível de exposição.	concentração de oxigénio dissolvido >60 % do valor de saturação; temperatura média de 26 ± 2 °C; 90 % de peixes sobreviventes nas cubas de controlo; concentrações medidas no ensaio situadas num intervalo de ±20 % relativamente à média dos valores medidos para cada nível de exposição.

▼**M6**

Apêndice 3

Algumas características químicas de uma água de diluição aceitável

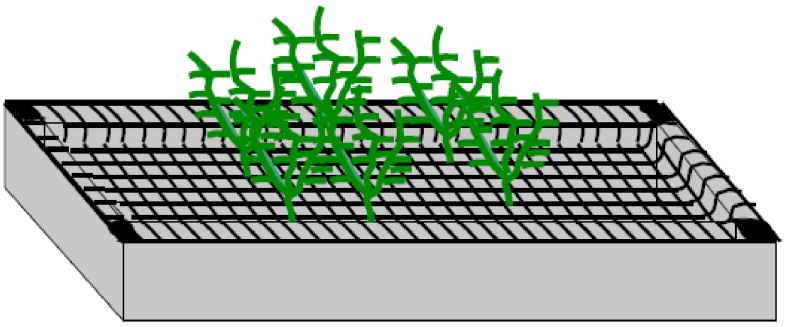
Componente	CONCENTRAÇÃO
Partículas	< 20 mg/l
Carbono orgânico total	< 2 mg/l
Amoníaco não-ionizado	< 1 µg/l
Cloro residual	< 10 µg/l
Pesticidas organofosforados totais	< 50 ng/l
Soma dos pesticidas organoclorados e dos bifenilos policlorados, totais	< 50 ng/l
Cloro orgânico total	< 25 ng/l

▼M6

Apêndice 4A

Substrato de desova para peixes-zebra

Placa de desova: Tabuleiro de instrumentos totalmente em vidro, por exemplo com 22 cm de comprimento, 15 cm de largura e 5,5 cm de profundidade, coberto com uma grelha amovível de arame de aço inoxidável (malha de 2 mm de largura). A base desta grelha de cobertura está a um nível inferior ao rebordo do tabuleiro.



Fixa-se um substrato de desova à grelha, de modo a formar uma estrutura na qual os peixes possam penetrar. São adequadas, por exemplo, plantas de aquário artificiais de plástico verde (nota: deve avaliar-se a possibilidade de adsorção do produto químico em estudo ao plástico). Mergulham-se os elementos de plástico num volume de água tépida suficiente, durante tempo suficiente para que deles não passem produtos químicos para a água utilizada nos ensaios. Caso sejam utilizados objetos de vidro, esses objetos não devem poder ferir os peixes nem tolhê-los quando os peixes executarem movimentos vigorosos.

A distância entre a placa e as paredes do tabuleiro de vidro não deve ser inferior a 3 cm, para que a desova não possa ocorrer fora daquela. Os ovos postos sobre a placa atravessam a grelha e podem ser colhidos 45 a 60 minutos após o início da iluminação. Os ovos são transparentes e não-aderentes, podendo ser contados com facilidade utilizando luz lateral. Quando cada cuba alberga cinco fêmeas, pode considerar-se baixo um número diário de ovos até 20, médio entre 20 e 100 e alto superior a 100. O mais tarde possível à noite ou de manhã muito cedo, retira-se a placa de desova, colhem-se os ovos e recoloca-se a placa na cuba de ensaio. A recolocação da placa na cuba não deve tardar mais de uma hora; caso contrário, o ressurgimento do substrato de desova pode induzir acasalamentos e desova fora de tempo. Se for necessário recolocar a placa de desova mais tarde do que uma hora passada, deve a mesma ser recolocada pelo menos nove horas após o início da iluminação. A essa hora tardia do dia já não haverá indução de desova.

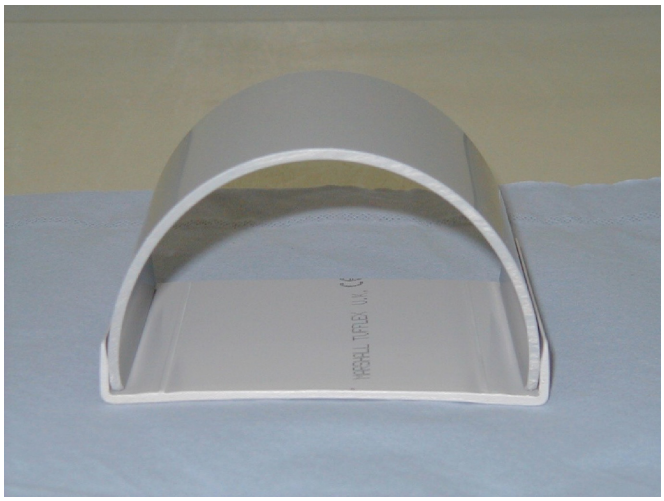
▼**M6**

Apêndice 4B

Substrato de desova para vairões-de-cabeça-gorda

Colocam-se em cada cuba de ensaio duas ou três combinações de placa e cobertura de desova de plástico/cerâmica/vidro ou aço inoxidável (por exemplo, uma secção de caleira cinzenta com 80 mm de comprimento pousada numa placa de 130 mm de comprimento com rebordos — ver a fotografia). Verificou-se que coberturas de PVC ou cerâmicas adequadamente tratadas podem servir de substrato de desova (Thorpe *et al*, 2007).

Recomenda-se que as coberturas sejam raspadas para melhorar a aderência. A placa também deve ter uma proteção que impeça os peixes de alcançarem os ovos que caiam, a menos que tenha sido demonstrado que os ovos aderem eficazmente ao substrato de desova utilizado.



A base destina-se a receber os ovos que, por não aderirem à superfície da cobertura, cairão no fundo da cuba (ou os ovos diretamente depositados na base plana de plástico do conjunto). Antes de serem utilizados, mergulham-se os substratos de desova em água de diluição durante, pelo menos, 12 horas.

REFERÊNCIAS

Thorpe, K.L., Benstead, R., Hutchinson, T.H., Tyler, C.R. (2007) An optimised experimental test procedure for measuring chemical effects on reproduction in the fathead minnow, *Pimephales promelas. Aquatic Toxicology*, 81, 90–98.

▼M6

Apêndice 5A

Avaliação de caracteres sexuais secundários no vairão-de-cabeça-gorda para deteção de determinados produtos químicos com atividade endócrina

Resumo

No vairão-de-cabeça-gorda adulto, entre as características físicas que podem ter importância nos ensaios de desreguladores do sistema endócrino contam-se as seguintes: cor do corpo (clara ou escura), padrões de coloração (ocorrência ou ausência de bandas verticais), forma do corpo (forma da cabeça e da região peitoral, distensão do abdómen) e caracteres sexuais secundários específicos (número e tamanho dos tubérculos nupciais, volume da massa adiposa dorsal e ovipositor)

No vairão-de-cabeça-gorda, os tubérculos nupciais localizam-se na (massa adiposa dorsal da) cabeça dos machos reprodutores, em geral com simetria bilateral (Jensen *et al*., 2001). Nas fêmeas de controlo e nos machos e fêmeas juvenis não se desenvolvem tubérculos (Jensen *et al*., 2001). Podem existir até oito tubérculos distintos em volta dos olhos e das narinas dos machos. O maior número de tubérculos e os tubérculos maiores localizam-se em duas linhas paralelas imediatamente abaixo das narinas e acima da boca. Em muitos peixes surgem grupos de tubérculos abaixo da mandíbula. O grupo mais próximo da boca é normalmente constituído por um só par, ao passo que o grupo em posição mais ventral pode compreender até quatro tubérculos. O número de tubérculos raramente excede 30 (intervalo: 18-28; Jensen *et al*., 2001). Os tubérculos (numericamente) predominantes formam uma estrutura arredondada e a sua altura é aproximadamente igual ao raio. A maior parte dos machos reprodutores também evidenciam, pelo menos, alguns tubérculos dilatados e salientes, não sendo possível individualizar a estrutura de cada tubérculo.

Alguns tipos de produtos químicos desreguladores do sistema endócrino podem provocar a ocorrência anormal de determinados caracteres sexuais secundários no sexo oposto. Por exemplo, agonistas dos recetores de androgénios, como a 17β--metiltestosterona ou a 17β-trembolona, podem provocar o aparecimento de tubérculos nupciais no vairão-de-cabeça-gorda fêmea (Smith, 1974; Ankley *et al.,* 2001, 2003) e os agonistas dos recetores de estrogénios podem reduzir o número ou a dimensão dos tubérculos nupciais nos machos (Miles-Richardson *et al.*, 1999; Harries *et al.*, 2000).

Segue-se uma descrição da caracterização dos tubérculos nupciais no vairão-de--cabeça-gorda, com base no protocolo seguido no laboratório da Agência de Proteção do Ambiente dos E.U.A. (Duluth, MN). Os produtos e equipamentos indicados podem ser substituídos por equivalentes disponíveis.

Para melhor visualização, pode utilizar-se uma lupa com iluminação ou um microscópio de dissecação com iluminação (3X). Examinam-se os peixes em posição dorsal, com a parte anterior para a frente (cabeça orientada para o observador).

a) Coloca-se o peixe numa placa de Petri (por exemplo numa placa com 100 mm de diâmetro) com a parte anterior para a frente e o ventre para baixo. Foca-se o dispositivo ótico, a fim de identificar os tubérculos. Roda-se com cuidado o peixe lateralmente, para identificar as zonas tuberculizadas. Contam-se e classificam-se os tubérculos.

b) Repete-se o exame na parte ventral da cabeça, colocando o peixe na placa de Petri com a parte anterior para a frente e o dorso para baixo.

c) O tempo necessário para examinar cada peixe é normalmente de 2 minutos.

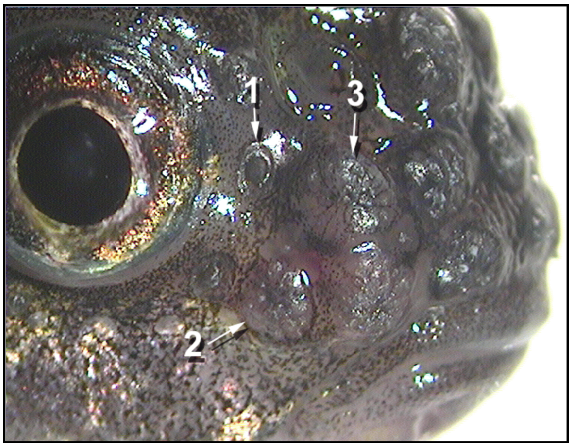
▼M6

Contagem e classificação dos tubérculos

Identificaram-se seis zonas específicas para avaliação da presença e do grau de desenvolvimento de tubérculos no vairão-de-cabeça-gorda adulto. Para localizar e quantificar os tubérculos presentes criou-se a matriz apresentada no final deste apêndice. Regista-se o número de tubérculos e estabelece-se a seguinte classificação dimensional para cada organismo: 0-ausente, 1-presente, 2-dilatado, 3-saliente (figura 1).

Classe 0: nenhum tubérculo presente; classe 1: tubérculo cuja altura é quase equivalente ao raio (diâmetro) apenas num ponto; classe 2: tubérculo dilatado, identificável por tecidos de aspeto semelhante a um asterisco, normalmente com uma base larga em todo o perímetro e estrias ou rugas a divergir do centro; a altura é muitas vezes mais irregular, mas o tubérculo também pode ser arredondado; classe 3: tubérculo saliente, normalmente bastante grande e arredondado, com estrutura menos definida; por vezes, estes tubérculos coalescem e formam uma massa única numa zona ou ocupando várias zonas (B, C e D na descrição *infra*); a cor e a forma destes tubérculos são semelhantes às da classe 2, mas, por vezes, os tubérculos são difíceis de individualizar nesta base. Utilizando este sistema de classificação de tubérculos, normalmente a pontuação atribuída é inferior a 50, no caso de um macho de controlo normal com 18 a 20 tubérculos (Jensen *et al.*, 2001).

Figura 1



Em alguns peixes, o número real de tubérculos numa determinada zona de classificação pode exceder as casas previstas na matriz (apêndice A). Se isso suceder, podem ser acrescentados números de classificação adicionais entre casas ou à esquerda ou direita destas. A matriz não tem, portanto, de ser simétrica. Outra técnica, para localização de tubérculos emparelhados ou que coalescem na vertical no plano horizontal da boca, compreende a indicação na mesma caixa da classificação correspondente a cada tubérculo de um par.

Regiões da localização:

A — Tubérculos situados em volta dos olhos. Localizados em volta do lado anterior do contorno dos olhos, indicam-se na matriz do lado dorsal para o lado ventral. É comum serem múltiplos nos machos maduros de controlo, não estão presentes nas fêmeas de controlo e geralmente ocorre um par (um tubérculo próximo de cada olho) ou um único tubérculo nas fêmeas expostas a androgénios.

B — Tubérculos situados entre as narinas (poros dos canais sensoriais). Ocorrem normalmente aos pares nos machos de controlo, com os níveis de desenvolvimento mais elevados — 2 (dilatados) ou 3 (salientes). Ausentes nas fêmeas de controlo, mas por vezes presentes e desenvolvidos em fêmeas expostas a androgénios.

C — Tubérculos situados em posição imediatamente anterior às narinas, paralelamente à boca. Nos machos maduros de controlo são geralmente dilatados ou salientes. Presentes ou dilatados em machos menos desenvolvidos e nas fêmeas expostas a androgénios.

▼M6

D — Tubérculos situados paralelamente, ao longo da linha definida pela boca. Nos machos de controlo, normalmente recebem uma classificação de desenvolvidos. Ausentes nas fêmeas de controlo, mas presentes nas fêmeas expostas a androgénios.

E — Tubérculos situados na mandíbula, perto da boca, normalmente pequenos e frequentemente aos pares. Variáveis nos machos de controlo e nos machos e fêmeas expostos.

F — Tubérculos situados em posição ventral relativamente à zona E. Geralmente pequenos e aos pares. Presentes nos machos de controlo e nas fêmeas expostas a androgénios.

REFERÊNCIAS

1) Ankley, G.T., Jensen, K.M., Kahl, M.D., Korte, J.J., Makynen, M.E. (2001). Description and evaluation of a short-term reproduction test with the fathead minnow *(Pimephales promelas). Environ. Toxicol. Chem.*, 20:1276-1290.

2) Ankley, G.T., Jensen, K.M., Makynen, E.A., Kahl, M.D., Korte, J.J., Hornung, M.W., Henry, T.R., Denny, J.S., Leino, R.L., Wilson, V.S., Cardon, M.C., Hartig, P.C., Gray, E.L. (2003). Effects of the androgenic growth promoter 17-β trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. *Environ. Toxicol. Chem.*, 22:1350-1360.

3) Harries, J.E., Runnalls, T., Hill, E., Harris, C.A., Maddix, S., Sumpter, J.P., Tyler, C.R. (2000). Development of a reproductive performance test for endocrine disrupting chemicals using pair-breeding fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environ. Sci. Technol.*, 34:3003-3011.

4) Jensen, K.M., Korte, J.J., Kahl, M.D., Pasha, M.S., Ankley, G.T. (2001). Aspects of basic reproductive biology and endocrinology in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Comp. Biochem. Physiol.*, C, 128:127-141.

5) Kahl, M.D., Jensen, K.M., Korte, J.J., Ankley, G.T. (2001). Effects of handling on endocrinology and reproductive performance of the fathead minnow. *J. Fish Biol.*, 59:515-523.

6) Miles-Richardson, S.R., Kramer, V.J., Fitzgerald, S.D., Render, J.A., Yamini, B., Barbee, S.J., Giesy, J.P. (1999). Effects of waterborne exposure of 17-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Aquat. Toxicol.*, 47:129-145.

7) Smith, R.J.F. (1974). Effects of 17-methyltestosterone on the dorsal pad and tubercles of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Can. J. Zool.*, 52:1031-1038.

Matriz de localização de tubérculos	**Pontuação**
Identificação _____	1-presente
Data _____	2-dilatado
Pontuação total _____	3-saliente

	A	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**						
	B	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**						
	C	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**
	D	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**
				E	**X1**	**X1**					
				F	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**			

▼M6

Apêndice 5B

Avaliação de caracteres sexuais secundários no peixe-do-arroz-japonês para deteção de determinados produtos químicos com atividade endócrina

Descreve-se a seguir o protocolo de medição dos processos papilares (*), que constituem os caracteres sexuais secundários do peixe-do-arroz-japonês (*Oryzias latipes*).

(*) Os processos papilares normalmente só aparecem em machos adultos e localizam-se nos raios da barbatana anal, entre o segundo e o sétimo ou oitavo raios desta, a contar da extremidade posterior da mesma (figuras 1 e 2). Aparecem raramente no primeiro raio da barbatana anal, a contar da extremidade posterior desta. Este protocolo normalizado contempla igualmente a medição de processos localizados no primeiro raio da barbatana anal (neste protocolo, o número de ordem dos raios inicia-se na extremidade posterior dessa barbatana).

1) Após excisão do fígado (apêndice 6), coloca-se a carcaça num tubo cónico com 10 ml de formol a 10 % tamponado a pH neutro (cabeça para cima, cauda para baixo). Se a gónada for fixada numa solução que não seja formol a 10 % tamponado a pH neutro, corta-se a carcaça transversalmente com uma lâmina, entre a região anterior da barbatana anal e o ânus, tendo o cuidado de não lesionar o gonóporo nem a gónada (figura 3). Coloca-se o lado da cabeça do corpo do peixe na solução fixadora, para conservar a gónada, e o lado da cauda em formol a 10 % tamponado a pH neutro, como se referiu.

2) Depois de colocar o corpo do peixe em formol a 10 % tamponado a pH neutro, segura-se a região anterior da barbatana anal com uma pinça e estende-se a barbatana durante cerca de 30 segundos, para a manter aberta. A fim de não lesionar os processos papilares com a pinça, puxa-se a barbatana anal segurando-a com a pinça numa extensão de alguns raios apenas da região anterior da barbatana.

3) Após manter a barbatana anal aberta durante cerca de 30 segundos, guarda-se o corpo do peixe à temperatura ambiente em formol a 10 % tamponado a pH neutro, até à medição dos processos papilares (a efetuar depois de um período de fixação mínimo de 24 horas).

Medição

1) Depois de fixar o corpo do peixe durante, pelo menos, 24 horas em formol a 10 % tamponado a pH neutro, retira-se a carcaça do peixe do tubo cónico e enxuga-se o formal com papel de filtro ou com um toalhete de papel.

2) Coloca-se o peixe com o abdómen para cima e corta-se cuidadosamente a barbatana anal utilizando uma pequena tesoura de dissecação (é preferível cortar a barbatana anal com uma pequena quantidade de pterigióforo).

3) Pega-se na barbatana anal assim cortada com uma pinça, segurando-a pela região anterior, e coloca-se a barbatana numa lâmina de vidro com algumas gotas de água. Cobre-se a barbatana anal com uma lamela de vidro. Há que ter o cuidado de não lesionar os processos papilares ao pegar na barbatana anal com a pinça.

4) Contam-se os segmentos de raio com processos papilares, utilizando o contador de um microscópio biológico (microscópio vertical ou microscópio invertido). Reconhece-se um processo papilar pela formação de um pequeno processo visível na margem posterior do segmento de raio. Inscreve-se o

▼M6

número de segmentos com processos papilares em cada raio de barbatana na folha de registo do ensaio (por exemplo primeiro raio: 0, segundo raio: 10, terceiro raio: 12 etc.) e depois a soma desses números na folha Excel correspondente a cada peixe. Se necessário, fotografa-se a barbatana anal e contam-se na fotografia os segmentos de raio que têm processos papilares.

5) Depois das contagens, coloca-se a barbatana anal no tubo cónico referido em 1 e guarda-se o tubo.

Figura 1.

Diferenças entre os sexos na forma e no tamanho da barbatana anal. A: macho; B: fêmea. [Oka, T.B. (1931). On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. *J. Fac. Sci.*, Universidade de Tóquio, IV, 2: 209-218.]

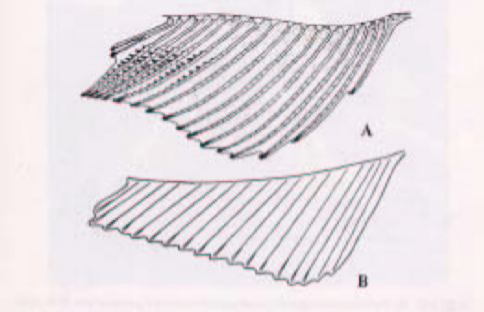
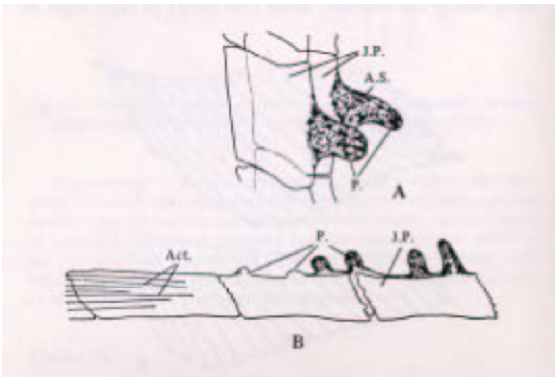


Figura 2.

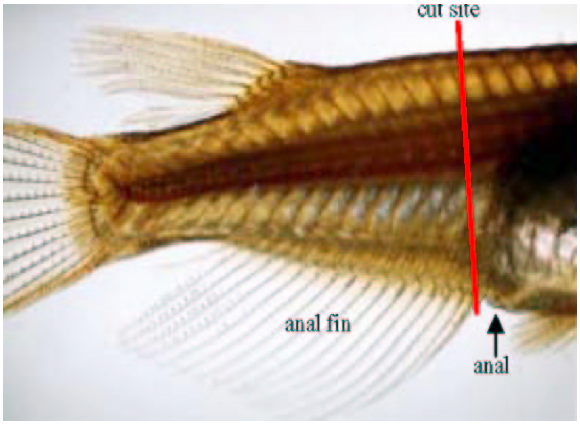
A: processos em segmentos de raios de barbatana anal; J.P.: segmento de raio; A.S.: espaço axial; P.: processo; B: extremidade distal do raio de barbatana. As actinotríquias (Act.) estão assinaladas na extremidade. [Oka, T.B. (1931). On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. *J. Fac. Sci.*, Universidade de Tóquio, IV, 2: 209-218.]



▼M6

Figura 3.

Fotografia do corpo de um peixe mostrando o sítio do corte a efetuar quando a gónada é fixada com uma solução diversa de formol a 10 % tamponado a pH neutro. Nesse caso, separa-se o resto do corpo através de um corte com uma lâmina, efetuado entre a região anterior da barbatana anal e o ânus (traço vermelho), após o que se coloca a parte do corpo do lado da cabeça na solução fixadora da gónada e a parte do corpo do lado da cauda em formol a 10 % tamponado a pH neutro.



▼M6

Apêndice 6

Protocolos recomendados para a colheita de amostras destinadas à análise da vitelogenina

É necessário tomar precauções para evitar contaminações cruzadas entre amostras de machos e fêmeas para determinação da vitelogenina.

Protocolo 1A: Colheita de sangue na artéria/veia caudal do vairão-de-cabeça-gorda

Após anestesia, secciona-se parcialmente o pedúnculo caudal com um bisturi e recolhe-se sangue da veia/artéria caudal num microtubo capilar heparinizado para determinação do hematócrito. Depois de colhido o sangue, separa-se rapidamente o plasma por centrifugação durante 3 minutos a 15 000 *g* (ou, em alternativa, 15 000 g durante 10 minutos, a 4 °C). Caso se pretenda fazê-lo, pode determinar-se a percentagem de hematócrito depois da centrifugação. Transfere-se o plasma do microtubo capilar para um tubo de centrifugação que já contenha 0,13 unidades de aprotinina (um inibidor de proteases), conservando-o a – 80 °C até à determinação da vitelogenina. A quantidade de plasma depende do tamanho do vairão-de-cabeça-gorda e este do sexo do peixe; o volume que pode ser colhido situa-se, em geral, entre 5 e 60 microlitros por peixe (Jensen *et al.*, 2001).

Protocolo 1B: Colheita de sangue no coração do vairão-de-cabeça-gorda

Em alternativa, também pode colher-se sangue por punção cardíaca, utilizando uma seringa heparinizada (1 000 unidades de heparina por mililitro). Transfere-se o sangue para tubos de Eppendorf (conservados em gelo) e centrifuga-se (7 000 g durante 5 minutos, à temperatura ambiente). Transfere-se o plasma para tubos de Eppendorf limpos (constituindo alíquotas, se o volume de plasma o permitir) e congela-se imediatamente a – 80 °C, até à realização das análises (Panter *et al.*, 1998).

Protocolo 2A: Excisão do fígado no peixe-do-arroz-japonês

Retirada dos peixes das cubas de ensaio

1) Retiram-se os peixes das cubas com um pequeno coador de rede, tendo o cuidado de não deixar cair nenhum peixe noutra cuba.

2) Em princípio, retiram-se os peixes pela ordem seguinte: cuba de controlo, cuba de controlo do solvente (se for o caso), cuba com a concentração mais baixa, cuba com a concentração média, cuba com a concentração mais elevada e cuba de controlo positivo. Além disso, numa determinada cuba, retiram-se todos os machos antes de se retirarem as fêmeas.

3) Determina-se o sexo de cada peixe com base nos caracteres sexuais secundários externos (por exemplo a forma da barbatana caudal).

4) Coloca-se cada peixe num recipiente de transporte e leva-se para a bancada onde se procederá à excisão dos fígados. Verifica-se se a etiqueta aposta no recipiente de transporte é conforme com a etiqueta aposta na cuba de ensaio e confirma-se se o número de peixes removidos da cuba e o número de peixes que nela restam corresponde ao esperado.

5) Se não for possível determinar o sexo com base no aspeto físico dos peixes, retiram-se todos os peixes da cuba. Nesse caso, determina-se o sexo por exame da gónada ou dos caracteres sexuais secundários ao microscópio estereoscópico.

▼**M6**

Excisão do fígado

1) Utilizando o pequeno coador de rede, transferem-se os peixes do recipiente de transporte para a solução anestesiante.

2) Uma vez os peixes anestesiados, transferem-se para um papel de filtro (ou para um toalhete de papel) com uma pinça de modelo normal. Ao pegar em cada peixe com a pinça, segura-se pela cabeça, para não lhe partir a cauda.

3) Enxuga-se a água à superfície do peixe com o papel de filtro (ou com o toalhete de papel).

4) Coloca-se o peixe com o abdómen para cima. Utilizando uma tesoura de dissecação, efetua-se uma pequena incisão transversal na região ventral, entre a base da cabeça e a zona média do abdómen.

5) Insere-se a tesoura de dissecação nessa pequena incisão e faz-se outra incisão, ao longo da linha média do abdómen, entre um ponto caudal relativamente aos opérculos branquiais e o lado craniano do ânus. Não inserir a tesoura de dissecação demasiado profundamente, para não lesionar o fígado e a gónada.

6) Efetuam-se as operações seguintes, utilizando um microscópio estereoscópico.

7) Coloca-se o peixe com o abdómen para cima num toalhete de papel (ou então numa placa de Petri de vidro ou numa lâmina de vidro).

8) Afastam-se as paredes da cavidade abdominal com pinças de precisão e expõem-se os órgãos internos. Se necessário, os órgãos internos também podem ser expostos após remoção de um dos lados da parede abdominal.

9) Utilizando outro par de pinças de precisão, expõe-se a zona de ligação do fígado e da vesícula biliar. Segura-se o canal biliar e efetua-se um corte para separar a vesícula biliar, tendo o cuidado de não a romper.

10) Segura-se o esófago e separa-se do mesmo modo o aparelho digestivo do fígado, tendo o cuidado de não derramar o conteúdo daquele. Procede-se à excisão, do ânus, da parte caudal do aparelho digestivo e retira-se o aparelho digestivo da cavidade abdominal.

11) Retira-se a massa adiposa e de outros tecidos que rodeiam o fígado, tendo o cuidado de não lesionar o fígado.

12) Segura-se a zona portal hepática com pinças de precisão e retira-se o fígado da cavidade abdominal.

13) Coloca-se o fígado na lâmina de vidro. Utilizando pinças de precisão, retira-se da superfície do fígado o tecido adiposo e outro que ainda reste (por exemplo, tecido da parede abdominal interna).

14) Pesa-se o fígado num microtubo de 1,5 ml previamente tarado, numa balança analítica eletrónica. Regista-se a leitura na folha de registo do ensaio (aproximação de 0,1 mg). Confirmam-se as informações identificadoras no rótulo do microtubo.

15) Coloca-se a tampa no microtubo que contém o fígado e guarda-se o tubo num suporte refrigerador (ou num suporte gelado).

16) Após a excisão de cada fígado, limpam-se os instrumentos de dissecação ou substituem-se estes por instrumentos limpos.

▼M6

17) Retira-se do mesmo modo o fígado a todos os peixes guardados nos recipientes de transporte.

18) Uma vez efetuada a excisão do fígado a todos os peixes guardados nos recipientes de transporte (ou seja, a todos os machos ou fêmeas de uma cuba), colocam-se os espécimes hepáticos num suporte de tubos, com uma etiqueta de identificação, e guardam-se no congelador. Se os fígados prosseguirem para o pré-tratamento pouco depois da excisão, levam-se os espécimes para a bancada correspondente num suporte refrigerador (ou num suporte gelado).

Após a excisão dos fígados, pode proceder-se à medição dos caracteres sexuais secundários nas carcaças de peixe.

Espécimes

Se os espécimes de fígado retirados dos peixes não passarem ao pré-tratamento pouco depois da excisão, guardam-se os espécimes a uma temperatura ≤ – 70 °C.

Figura 1

Corte com tesoura em posição imediatamente anterior às barbatanas peitorais.

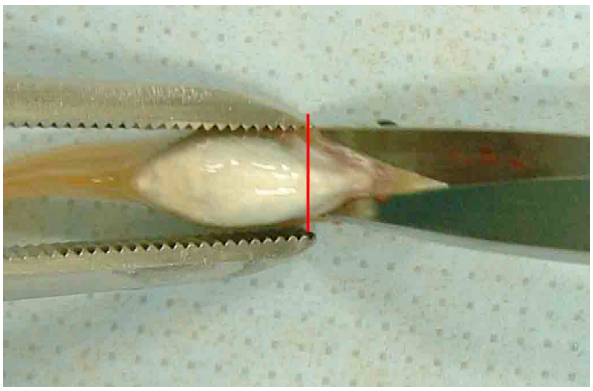
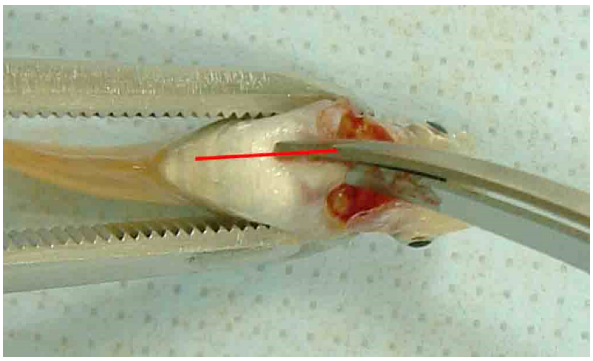


Figura 2

Incisão com tesoura ao longo da linha média abdominal, até um ponto cerca de 2 mm anterior ao ânus.



▼M6

Figura 3

Afastamento das paredes abdominais com uma pinça, de modo a expor o fígado e outros órgãos internos. (Em alternativa, as paredes abdominais também podem ser afastadas lateralmente e ser mantidas nessa posição com alfinetes.)

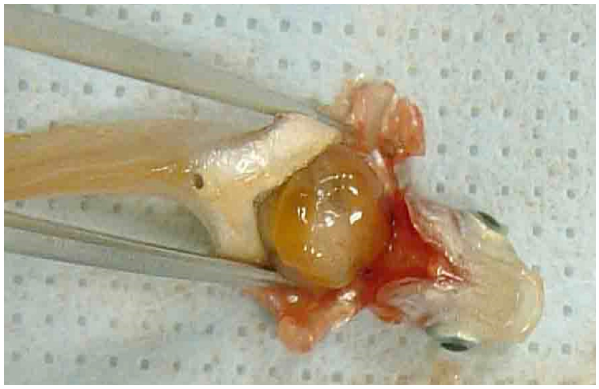


Figura 4

Dissecação e excisão do fígado com uma pinça, sem efetuar cortes.

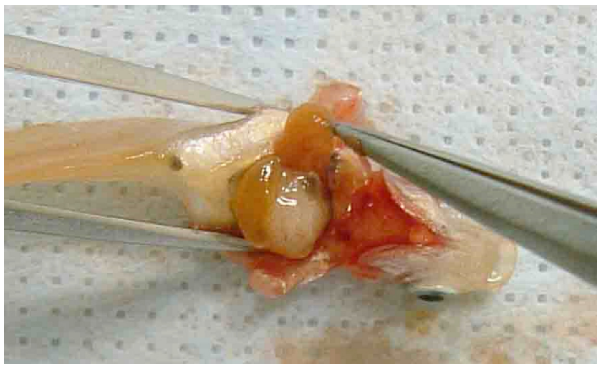


Figura 5

Retirada cuidadosa dos intestinos com uma pinça.



▼M6

Figura 6

Corte com tesoura das duas extremidades dos intestinos e das aderências do mesentério.

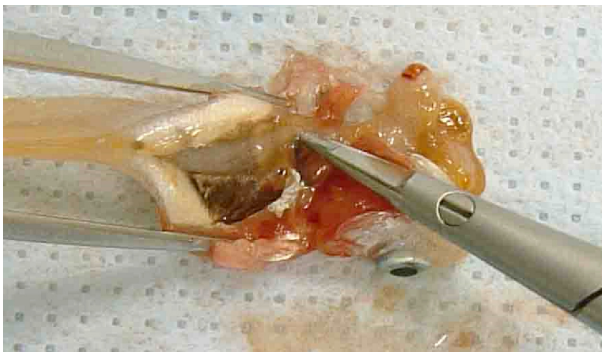


Figura 7 (fêmea)

O procedimento é idêntico para as fêmeas.

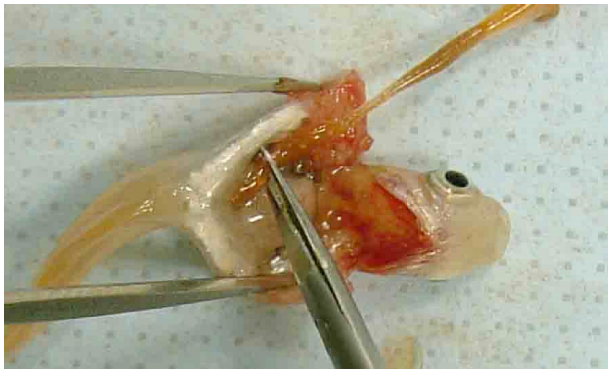
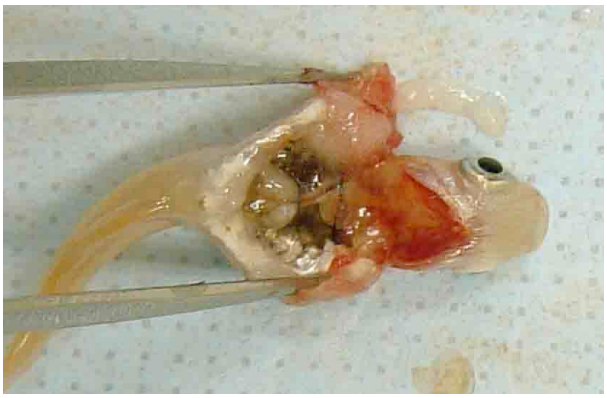


Figura 8

Procedimento concluído.



Protocolo 2B: Pré-tratamento do fígado para análise da vitelogenina no paixe-do-arroz-japonês (*Oryzias latipes*)

Retira-se o frasco de tampão do homogeneizado do *kit* ELISA e refrigera-se o mesmo com gelo moído (temperatura da solução: ≤4 °C). Caso se utilize tampão do homogeneizado do sistema ELISA da EnBio, deixa-se descongelar a solução à temperatura ambiente e depois refrigera-se o frasco com gelo moído.

▼**M6**

Calcula-se o volume de tampão do homogeneizado para o fígado com base no peso deste (adicionam-se 50 µl de tampão do homogeneizado por miligrama de fígado a homogeneizar). Por exemplo, se o fígado pesar 4,5 mg, utilizam-se para o efeito 225 µl de tampão do homogeneizado. Elabora-se uma lista com o volume de tampão do homogeneizado correspondente a cada fígado.

Preparação do fígado para o pré-tratamento

1) Imediatamente antes do pré-tratamento, retira-se do congelador o microtubo de 1,5 ml que contém o fígado.

2) Para evitar contaminações com vitelogenina, efetua-se o pré-tratamento dos fígados dos machos antes das fêmeas. Além disso, procede-se ao pré-tratamento dos vários grupos ensaiados pela ordem seguinte: cuba de controlo, cuba de controlo do solvente (se for o caso), cuba com a concentração mais baixa, cuba com a concentração média, cuba com a concentração mais elevada e cuba de controlo positivo.

3) O número de microtubos de 1,5 ml com amostras de fígado retirados do congelador numa dada ocasião não pode exceder o número de tubos que podem ser centrifugados de imediato.

4) Colocam-se os microtubos de 1,5 ml com as amostras de fígado no suporte gelado por ordem de numeração dos espécimes (não é necessário descongelar o fígado).

Pré-tratamento

1. Adição do tampão de homogeneização

   1) Verifica-se na lista o volume de tampão do homogeneizado a utilizar para a amostra de fígado e regula-se a micropipeta (100-1 000 µl) no volume adequado. Coloca-se uma ponta limpa na micropipeta.

   2) Retira-se tampão do homogeneizado do frasco onde está guardado e adiciona-se ao microtubo de 1,5 ml que contém a amostra de fígado.

   3) Procedendo do mesmo modo, adiciona-se tampão do homogeneizado a todos os microtubos de 1,5 ml que contém as amostras de fígado. Não é necessário substituir a ponta da micropipeta, a menos que fique contaminada ou se suspeite disso.

2. Homogeneização do fígado

   1) Fixa-se um novo pilão de homogeneização no homogeneizador do microtubo.

   2) Insere-se o pilão no microtubo de 1,5 ml. Segura-se o homogeneizador do microtubo e comprime-se o fígado entre a superfície do pilão e a parede interna do microtubo.

   3) Faz-se funcionar o homogeneizador do microtubo durante 10 a 20 segundos. Durante esta operação, mantém-se o microtubo de 1,5 ml refrigerado com gelo moído.

   4) Retira-se o pilão do microtubo e deixa-se este em repouso durante cerca de 10 segundos. Em seguida, avalia-se visualmente o estado da suspensão.

   5) Caso se detetem fragmentos de fígado na suspensão, repetem-se as operações 3 e 4 para obter um homogeneizado de fígado satisfatório.

▼**M6**

6) Mantém-se a suspensão de homogeneizado de fígado no suporte gelado até à centrifugação.

7) É necessário utilizar um pilão novo para cada homogeneizado.

8) Homogeneízam-se todos os fígados com tampão do homogeneizado conforme se descreveu.

3. Centrifugação da suspensão de homogeneizado hepático

1) Confirma-se que a temperatura da câmara de centrifugação refrigerada é ≤ 5 °C.

2) Introduzem-se os microtubos de 1,5 ml com a suspensão de homogeneizado hepático na câmara de centrifugação refrigerada (se necessário, reequilibra-se).

3) Centrifuga-se a suspensão de homogeneizado hepático a 13 000 *g* durante 10 minutos, a temperatura ≤ 5 °C. Se os sobrenadantes se separarem convenientemente, a força centrífuga e o tempo de centrifugação podem, se necessário, ser ajustados.

4) Após a centrifugação, verifica-se se os sobrenadantes se separaram convenientemente (superfície: lípidos; camada intermédia: sobrenadante; camada inferior: tecido hepático). Se a separação não for adequada, procede-se a nova centrifugação da suspensão nas mesmas condições.

5) Retiram-se todos os espécimes da câmara de centrifugação refrigerada e dispõem-se no suporte gelado por ordem de numeração dos espécimes. Há que ter cuidado para, depois da centrifugação, não ressuspender as camadas separadas.

4. Recolha do sobrenadante

1) Colocam-se num suporte de tubos quatro microtubos de 0,5 ml para recolha de sobrenadante.

2) Utilizando a micropipeta, retiram-se 30 µl de um dos sobrenadantes (fase intermédia separada) e transferem-se para um dos microtubos de 0,5 ml. Há que ter cuidado para não recolher lípidos da camada superior nem tecido hepático da camada inferior.

3) Procedendo do modo descrito, transfere-se mais sobrenadante para dois outros microtubos de 0,5 ml.

4) Recolhe-se o resto do sobrenadante com a micropipeta (se possível, ≥ 100 µl) e transfere-se o mesmo para o último microtubo de 0,5 ml. Há que ter cuidado para não recolher lípidos da camada superior nem tecido hepático da camada inferior.

5) Tapam-se os microtubos de 0,5 ml e escreve-se o volume de sobrenadante no rótulo respetivo. Refrigeram-se imediatamente os microtubos no suporte gelado.

6) Substitui-se a ponta da micropipeta para cada sobrenadante. Caso fique agarrada à ponta da micropipeta uma grande quantidade de lípidos, substitui-se a ponta imediatamente, para evitar a contaminação do extrato de fígado com gorduras.

7) Transfere-se todo o sobrenadante centrifugado para quatro microtubos de 0,5 ml conforme se descreveu.

▼M6

8) Uma vez transferido todo o sobrenadante para microtubos de 0,5 ml, colocam-se os microtubos com um rótulo identificador no suporte de tubos e coloca-se este imediatamente no congelador. Se a determinação das concentrações de vitelogenina decorrer logo a seguir ao pré-tratamento, mantém-se um microtubo de 0,5 ml (com 30 µl de sobrenadante) refrigerado no suporte de tubos e transfere-se esse microtubo para a bancada onde irá realizar-se o ensaio ELISA. Nesse caso, colocam-se os outros microtubos no suporte de tubos e coloca-se este no congelador.

9) Uma vez recolhido o sobrenadante, eliminam-se convenientemente os resíduos.

Conservação dos espécimes

Até serem utilizados no método ELISA, conservam-se os microtubos de 0,5 ml que contêm o sobrenadante do homogeneizado hepático a temperatura ≤ – 70 °C.

Protocolo 3A: Colheita de sangue na artéria/veia caudal do peixe-zebra

Imediatamente após a anestesia, corta-se transversalmente o pedúnculo caudal e colhe-se sangue da artéria/veia caudal para um microtubo capilar heparinizado para determinação do hematócrito. O volume de sangue depende do tamanho do peixe e varia entre 5 e 15 µl. Adiciona-se ao microtubo capilar volume idêntico de tampão aprotinina (6 µg/ml em tampão fosfato, PBS) e separa-se o plasma do sangue por centrifugação (5 minutos a 600 g). Transfere-se o plasma para tubos de ensaio e conservam-se estes a – 20 °C até à determinação analítica da vitelogenina ou de outras proteínas relevantes.

Protocolo 3B: Colheita de sangue por punção cardíaca no peixe-zebra

Para evitar a coagulação do sangue e a degradação proteica, colhem-se as amostras numa solução de tampão fosfato (PBS) com 1 000 unidades de heparina por mililitro e 2 TIU (unidades de inibidor da tripsina) do inibidor das proteases aprotinina por mililitro. Recomenda-se a utilização de heparina (sal de amónio) e de aprotinina liofilizada como ingredientes do tampão. Para colher as amostras, recomenda-se a utilização de seringas (de 1 ml) com uma agulha fina fixa (por exemplo Braun Omnikan-F). Enchem-se previamente as seringas com tampão (aproximadamente 100 µl), para eluir completamente os pequenos volumes de sangue colhidos em cada peixe. Colhem-se as amostras de sangue por punção cardíaca. Começa-se por anestesiar o peixe com MS-222 (100 mg/l). Um plano de anestesia correto permitirá ao utilizador distinguir o batimento cardíaco do peixe-zebra. Ao efetuar a punção cardíaca, mantém-se o pistão da seringa sob ligeira tensão. O volume de sangue que pode ser recolhido situa-se entre 20 e 40 microlitros. Após a punção cardíaca, transfere-se a mistura de sangue e tampão para um tubo de ensaio. Separa-se o plasma do resto do sangue por centrifugação (20 minutos a 5 000 g) e conserva-se o plasma a – 80 °C até às análises.

Protocolo 3C: Procedimento normalizado de homogeneização da cabeça e da cauda do peixe-zebra

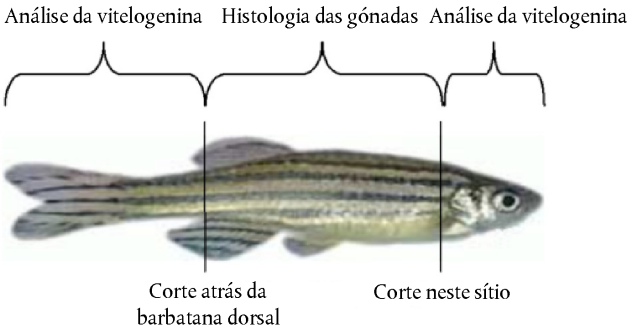
1) Anestesia-se e eutanasia-se cada peixe conforme consta da descrição do ensaio.

2) Cortam-se a cabeça e a cauda de cada peixe como ilustrado na figura 1.

Importante: Para evitar que machos não-induzidos sejam contaminados por vitelogenina proveniente de fêmeas ou de machos induzidos, é necessário lavar e limpar corretamente (por exemplo com etanol a 96 %) os instrumentos de dissecação e a placa de corte antes de passar ao peixe seguinte.

▼**M6**

Figura 1



3) Pesa-se com aproximação de 1 mg o conjunto da cabeça e da cauda de cada peixe.

4) Após pesagem, colocam-se ambas as partes em tubos adequados (por exemplo tubos de Eppendorf de 1,5 ml) e congela-se a – 80 °C até à homogeneização ou procede-se a homogeneização imediata sobre gelo com dois pilões de plástico. (Podem ser utilizados outros métodos, se forem realizados sobre gelo e deles resultar uma massa homogénea). Importante: É necessário numerar corretamente os tubos, a fim de que a cabeça e a cauda de cada peixe possam ser relacionadas com o resto do corpo correspondente, utilizado na histologia das gónadas.

5) Uma vez homogeneizada a massa, adiciona-se uma quantidade de tampão de homogeneização (*) gelado correspondente a quatro vezes o peso dos tecidos. A mistura deve continuar a ser homogeneizada com os pilões até o estar completamente. Nota importante: É necessário utilizar pilões novos para cada peixe.

6) Colocam-se as amostras em gelo até à centrifugação a 4 °C, durante 30 minutos, a 50 000 g.

7) Por meio de uma pipeta, transferem-se volumes de 20 µl do sobrenadante para, pelo menos, dois tubos, mergulhando para o efeito a ponta da pipeta através da camada superficial lipídica e aspirando cuidadosamente sobrenadante sem resíduos da fração lipídica nem da camada depositada.

8) Armazenam-se os tubos a – 80 °C até serem utilizados.

(*) **Tampão de homogeneização:**

— (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4; 1 % da mistura de inibidores de proteases da Sigma): 12 ml de Tris-HCl, pH 7,4, + 120 µl da mistura de inibidores de proteases.

— TRIS: TRIS-ULTRAPURO (ICN), por exemplo da Bie & Berntsen, Dinamarca.

— Mistura de inibidores de proteases: da Sigma, para tecidos de mamíferos (n.º do produto P8340).

— *Nota:* O tampão de homogeneização tem de ser utilizado no próprio dia de preparação e de ser mantido em gelo durante esse período.

▼**M6**

Apêndice 7

Amostras enriquecidas com vitelogenina e padrão de referência interno

Em cada dia em que se realizem determinações da vitelogenina, analisa-se uma amostra enriquecida com um padrão de referência interno. Na preparação do padrão de referência interno é necessário utilizar vitelogenina de um lote diferente do utilizado na preparação dos padrões de calibração para o ensaio em curso.

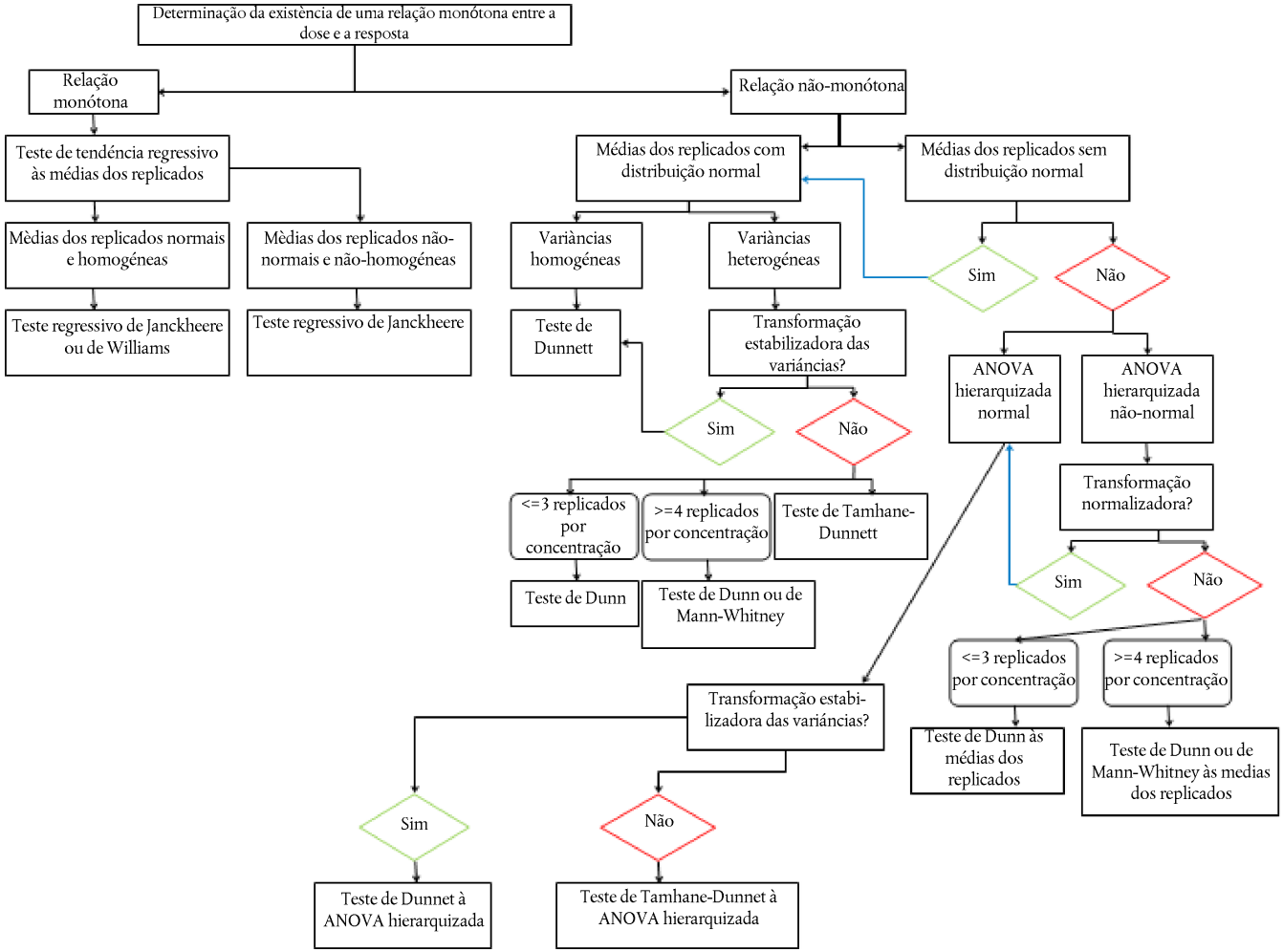
Prepara-se a amostra enriquecida adicionando uma quantidade conhecida do padrão interno a uma amostra de plasma de machos de controlo. Enriquece-se a amostra de modo a obter uma concentração de vitelogenina 10 a 100 vezes maior do que a concentração de vitelogenina esperada nos peixes machos de controlo. A amostra de plasma macho de controlo a enriquecer pode provir de um só peixe ou ser composta a partir de vários peixes.

Analisa-se uma subamostra de plasma de machos de controlo não-enriquecido em, pelo menos, dois alvéolos duplicados. Analisa-se a amostra enriquecida igualmente em, pelo menos, dois alvéolos duplicados. A fim de determinar a concentração esperada, adiciona-se a quantidade média de vitelogenina determinada nas duas amostras de plasma de machos de controlo não-enriquecido à quantidade de vitelogenina adicionada para enriquecer as amostras. Juntamente com os resultados de cada série de ensaios realizados no dia, indica-se no relatório a relação entre esta concentração esperada e a concentração medida.

▼M6

Apêndice 8

Fluxograma de decisão para a análise estatística



▼M6

C.38. ENSAIO DE METAMORFOSE EM ANFÍBIOS

INTRODUÇÃO

1. Este método é equivalente ao *Test Guideline* TG 231 (2009) da OCDE. A necessidade de desenvolver e validar um ensaio capaz de detetar produtos químicos com atividade no sistema tiróideo de vertebrados decorre dos receios acerca da possibilidade de os níveis ambientais dos produtos químicos em causa serem passíveis de ter efeitos indesejados nas populações humanas e na fauna e flora selvagens. Em 1998, a OCDE deu início a uma ação de elevada prioridade com vista à revisão dos *Test Guidelines* existentes e à elaboração de novos *Test Guidelines* para despistagem e ensaio de potenciais desreguladores do sistema endócrino. Um dos elementos dessa ação foi a elaboração de um *Test Guideline* para despistagem de produtos químicos com atividade no sistema tiróideo de espécies de vertebrados. Foram propostos uma versão aperfeiçoada do Estudo da Toxicidade Oral por Dose Repetida durante 28 dias em Roedores (capítulo B.7 deste anexo) e o Ensaio de Metamorfose em Anfíbios. O método de ensaio B.7 aperfeiçoado foi objeto de um processo de validação, tendo sido publicado o correspondente método de ensaio revisto. O Ensaio de Metamorfose em Anfíbios foi objeto de um vasto programa de validação, que compreendeu a realização de estudos intralaboratoriais e interlaboratoriais para demonstrar a pertinência e a fiabilidade do ensaio (1)(2). Subsequentemente, o trabalho de validação do ensaio foi objeto de uma avaliação por pares no âmbito de um painel de peritos independentes (3). O presente método constitui o corolário da experiência adquirida durante os estudos de validação da deteção de produtos químicos com atividade na tiroide, assim como dos trabalhos realizados noutros âmbitos nos países membros da OCDE.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

2. O Ensaio de Metamorfose em Anfíbios é um ensaio de despistagem para identificação empírica de produtos químicos passíveis de interferirem no funcionamento normal do eixo hipotálamo-hipófise-tiroide. Na medida em que se baseia nas funções e estruturas conservadas desse eixo, este ensaio constitui um modelo geral para vertebrados. É um ensaio importante, porque a metamorfose dos anfíbios é um processo dependente da tiroide bem estudado, reativo aos produtos químicos com atividade no eixo hipotálamo-hipófise-tiroide, sendo atualmente o único ensaio capaz de detetar atividade tiróidea em animais em processo de evolução morfológica.

3. O esquema experimental geral compreende a exposição de girinos de *Xenopus laevis* no estádio 51, durante 21 dias, a, no mínimo, três concentrações diferentes de um produto químico e a um ensaio de controlo da água de diluição. Cada concentração é ensaiada em quatro replicados. No início do ensaio, a densidade de espécimes é de 20 girinos por cuba de ensaio em todos os grupos expostos. Os parâmetros a examinar são o comprimento das patas traseiras, a distância entre a boca e a cloaca, o estádio de desenvolvimento, o peso húmido, a histologia da tiroide e a mortalidade diária.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Espécies ensaiadas

4. A *Xenopus laevis* é criada sem dificuldades em laboratórios de todo o mundo e também é fácil de obter através dos fornecedores comerciais. A reprodução desta espécie é facilmente induzida ao longo de todo o ano por meio de injeções de gonadotropina coriónica humana (hCG), podendo criar-se sem dificuldades, em grande número, as larvas resultantes até um estádio de desenvolvimento que possibilite a aplicação de um

▼M6

protocolo de ensaio específico para esse estádio. É preferível que as larvas utilizadas no ensaio provenham de adultos criados no mesmo laboratório. Em alternativa, embora não seja o método preferido, podem aclimatar-se no laboratório onde irá realizar-se o ensaio ovos ou embriões de outra proveniência. Não é, porém, admissível a utilização neste ensaio de animais em estado larvar não provenientes do próprio laboratório.

Equipamento e fornecimentos

5. São necessários os seguintes fornecimentos e equipamento para a realização deste ensaio:

a) Sistema de exposição (adiante descrito);

b) Aquários de vidro ou de aço inoxidável (adiante descritos);

c) Tanques de reprodução;

d) Aparelhos de controlo de temperatura (dispositivos de aquecimento ou de arrefecimento, reguláveis a 22 °C ± 1 °C);

e) Termómetro;

f) Microscópio binocular de dissecação;

g) Máquina fotográfica digital com resolução mínima de 4 megapixels e função micro;

h) *Software* de digitalização de imagens;

i) Placas de Petri (por exemplo 100 mm × 15 mm) ou cubas de plástico transparente de tamanho semelhante;

j) Balança analítica com uma aproximação de três casas decimais (mg).

k) Aparelho de medição do oxigénio dissolvido;

l) Medidor de pH;

m) Aparelho de medição (em lux) da intensidade luminosa;

n) Diversos utensílios e material de vidro de laboratório;

o) Pipetas reguláveis (de 10 µl a 5 000 µl) ou série de pipetas dos volumes equivalentes;

p) Quantidade do produto químico em estudo suficiente para a realização deste, de preferência de um único lote;

q) Instrumentação analítica adequada para o produto químico em estudo ou contratação dos serviços analíticos necessários.

Possibilidade de ensaiar o produto químico em estudo

6. O Ensaio de Metamorfose em Anfíbios baseia-se num protocolo de exposição em fase aquosa que passa pela introdução do produto químico em estudo nas cubas de ensaio por meio de um sistema de fluxo contínuo. Porém, os métodos de fluxo contínuo condicionam os tipos de produtos químicos que podem ser ensaiados, em função das propriedades físico-químicas dos mesmos. Antes de aplicar este protocolo é, portanto, necessário obter informações de base acerca do produto químico em causa que

▼M6

permitam determinar se o mesmo pode ou não ser-lhe aplicado, bem como consultar o documento de orientações da OCDE sobre ensaios de toxicidade em meio aquático de substâncias e misturas difíceis (4). Entre as características indicadoras de que um produto químico pode ser difícil de ensaiar em sistemas aquáticos contam-se as seguintes: coeficiente de partição *n*-octanol/água (log K_{ow}) elevado, volatilidade elevada, tendência para hidrólise e tendência para fotólise nas condições de iluminação ambiente do laboratório. Ao verificar se é possível realizar o ensaio, pode ser pertinente ter em conta outros fatores, a avaliar caso a caso. Se não for possível realizar um ensaio de fluxo contínuo do produto químico em estudo, pode recorrer-se a um sistema de renovação estático. Se o produto químico em causa não se adaptar a nenhum destes sistemas, em princípio não se lhe poderá aplicar o presente protocolo.

Sistema de exposição

7. Sempre que possível, prefere-se um sistema de diluição de fluxo contínuo a um sistema de renovação estático. Se as propriedades físicas e/ou químicas do produto químico em estudo não se adaptarem a um sistema de diluição de fluxo contínuo, pode utilizar-se um sistema de exposição alternativo (por exemplo um sistema de renovação estático). Os componentes do sistema em contacto com a água devem ser de vidro, de aço inoxidável e/ou de politetrafluoroetileno. No entanto, podem ser utilizados plásticos adequados que não perturbem o estudo. As cubas de exposição devem ser aquários de vidro ou de aço inoxidável equipados com colunas (*standpipes*) que permitam manter o volume entre 4,0 l e 10,0 l e a profundidade mínima entre 10 cm e 15 cm. O sistema deve suportar todas as concentrações de exposição, assim como os ensaios de controlo, estando previstos quatro replicados por nível de exposição. O caudal que aflui a cada cuba deve ser constante (por exemplo 25 ml/minuto), a fim de que as condições biológicas e a exposição ao produto químico se mantenham estáveis. Para reduzir potenciais efeitos posicionais, nomeadamente ligeiras variações de temperatura, da intensidade luminosa etc., distribuem-se as cubas com as diversas concentrações de exposição de modo aleatório no sistema de exposição. Utiliza-se iluminação fluorescente para gerar um fotoperíodo de 12 horas de luz seguidas de 12 horas de escuridão, devendo a intensidade à superfície da água estar compreendida entre 600 e 2 000 lux (lúmen/m^2). Em cada cuba de ensaio, é necessário manter a temperatura da água a 22 °C ± 1 °C e o pH entre 6,5 e 8,5, tendo a concentração de oxigénio dissolvido de ser superior a 3,5 mg/l (> 40 % da saturação com ar). Medem-se a temperatura, o pH e a concentração de oxigénio dissolvido pelo menos uma vez por semana. De preferência, mede-se a temperatura continuamente em, pelo menos, uma cuba de ensaio. Descrevem-se no apêndice 1 as condições experimentais de execução do protocolo. Para mais informações sobre a constituição de sistemas de exposição de fluxo contínuo e/ou de sistemas de renovação estáticos, ver o guia da ASTM para a realização de ensaios de toxicidade aguda em peixes, macroinvertebrados e anfíbios (5) e os ensaios gerais de toxicidade em meio aquático.

Qualidade da água

8. Pode utilizar-se qualquer água disponível no local (por exemplo água de nascente ou água da torneira filtrada por carvão) que permita o crescimento e o desenvolvimento normais de girinos de *Xenopus Laevis*. Visto que a qualidade da água pode diferir substancialmente de uma zona para outra, é necessário analisar a qualidade da água, sobretudo no caso de não se dispor de dados históricos sobre a utilização da mesma na criação de *Xenopus*. Importa, em especial, que a água não contenha cobre, cloro ou cloraminas, que são tóxicos para as rãs e os girinos. Recomenda-se igualmente a determinação analítica dos níveis de fundo de fluoretos,

▼M6

percloratos e cloratos (subprodutos da desinfeção realizada para tornar a água potável) na água, pois estes aniões são substratos do transportador de iodo da glândula tiroide e níveis elevados de qualquer deles podem perturbar os resultados do estudo. Analisa-se a água antes de iniciar o ensaio e, normalmente, a água deve estar isenta destes aniões.

Concentração de iodo na água utilizada no ensaio

9. Para que a glândula tiroide possa sintetizar as hormonas tiróideas, as larvas têm de dispor de iodo suficiente, proveniente da água e dos alimentos. Não existem ainda recomendações empíricas sobre concentrações mínimas de iodetos. Todavia, a disponibilidade de iodetos pode afetar a capacidade de resposta do sistema tiróideo aos agentes com atividade na tiroide e sabe-se que influencia a atividade basal da glândula tiroide, aspeto a ter em conta na interpretação de resultados histopatológicos da tiroide. Há, portanto, que incluir no relatório as concentrações de iodetos medidas na água utilizada no ensaio. Com base nos dados provenientes dos estudos de validação, comprovou-se que o protocolo funciona bem quando a concentração de iodetos (I^-) na água utilizada nos ensaio se situa entre 0,5 μg/l e 10 μg/l. Idealmente, a concentração de iodetos nessa água não deve ser inferior a 0,5 μg/l. Se a água utilizada no ensaio for obtida por reconstituição de água desionizada, é necessário adicionar iodo de modo a obter uma concentração não inferior a 0,5 μg/l. É necessário mencionar no relatório qualquer outro suplemento de iodetos ou de outros sais incorporado na água utilizada no ensaio.

Manutenção dos animais

Tratamento e reprodução dos adultos

10. O tratamento a dar aos adultos e a reprodução dos mesmos pautam-se por orientações genéricas. Para mais informações, pode consultar-se o guia geral para a realização de ensaios de teratogénese em embriões de rãs (FETAX) (6). Esse guia apresenta um exemplo de métodos adequados de tratamento e de reprodução, mas não é obrigatória uma observância estrita. Para induzir a reprodução, injeta-se gonadotropina coriónica humana (hCG) em (3 a 5) pares de machos e fêmeas adultos. Injetam-se fêmeas e machos com 800 UI a 1 000 UI e 600 UI a 800 UI, respetivamente, de hCG dissolvida em soro fisiológico 0,6-0,9 %. Para estimular o amplexo, colocam-se os pares reprodutores em tanques grandes, em condições estáticas, não os perturbando. No fundo de cada tanque de reprodução, deve existir uma rede de aço inoxidável ou de plástico, para que as massas de ovos possam cair para o fundo falso assim constituído. Normalmente, as rãs injetadas ao fim da tarde porão a maior parte dos ovos a meio da manhã do dia seguinte. Logo que se disponha de uma quantidade suficiente de ovos fertilizados, retiram-se os adultos dos tanques de reprodução.

Tratamento e seleção das larvas

11. Depois de se retirarem os adultos dos tanques de reprodução, recolhem-se os ovos e avalia-se a viabilidade dos mesmos numa amostra representativa dos embriões colhida em cada tanque. Escolhem-se a melhor ou as melhores posturas (recomendam-se duas a três para avaliar a qualidade das posturas) com base na viabilidade dos embriões e na presença de um número adequado deles (mínimo 1 500). Os organismos utilizados no estudo devem provir da mesma postura (ou seja, não pode haver mistura de organismos provenientes de posturas diferentes). Transferem-se os embriões para um prato ou tabuleiro grande e retiram-se os ovos manifestamente mortos ou anormais [ver definições na referência (5)], utilizando para o efeito uma pipeta ou um conta-gotas. Transferem-se separadamente

▼M6

os embriões sãos de cada uma das três posturas para três tanques de eclosão. Quatro dias após esta transferência, seleciona-se a melhor postura, com base em critérios de viabilidade e de êxito da eclosão, após o que se repartem as larvas dessa postura por um número adequado de tanques de criação a 22 °C ± 1 °C. Transferem-se larvas adicionais para tanques suplementares, a fim de servirem de substitutas caso haja mortes nos tanques de criação durante a primeira semana. Este processo permite manter uma densidade de organismos coerente, o que reduz as divergências de desenvolvimento no universo de uma dada postura. Procede-se diariamente a uma aspiração de limpeza por sifonagem dos tanques de criação. Por precaução, preferem-se luvas de vinilo ou nitrilo a luvas de látex. Retiram-se diariamente os indivíduos mortos e substituem-se por larvas do grupo de substituição, a fim de manter uma densidade de organismos constante durante a primeira semana. Alimentam-se as larvas pelo menos duas vezes por dia.

12. Durante a fase de pré-exposição, aclimatam-se os girinos às condições reais da fase de exposição, designadamente ao tipo de alimentos, à temperatura, ao ciclo luz-escuridão e ao meio de criação. Recomenda-se, portanto, a utilização da mesma água de criação/diluição na fase de pré-exposição e na fase de exposição. Caso os girinos sejam mantidos num sistema de criação estático na fase de pré-exposição, é necessário substituir completamente o meio de criação pelo menos duas vezes por semana. Importa evitar a sobrepopulação causada por uma densidade de larvas elevada durante o período de pré-exposição, dado que, por efeito desta, o desenvolvimento dos girinos poderia ser depois fortemente afetado na fase de ensaio. Por conseguinte, a densidade de criação não deve exceder, aproximadamente, quatro girinos por litro de meio de criação (no sistema de exposição estático) ou 10 girinos por litro de meio de criação (considerando um caudal de, por exemplo, 50 ml/minuto no sistema de pré-exposição ou de criação). Nestas condições, os girinos desenvolvem-se dos estádios 45/46 para o estádio 51 em doze dias. Diariamente, examinam-se girinos representativos desta população de reserva a fim de determinar o estádio de desenvolvimento em que se encontram, para definir o momento adequado para início da exposição. Há que procurar minimizar a tensão e os traumas causados aos girinos, em especial durante as movimentações, a limpeza dos aquários e a manipulação das larvas. Há que evitar situações e ações que possam gerar tensão, como ruídos fortes e/ou continuados, batimentos ou vibrações nos aquários, excesso de atividade no laboratório e variações rápidas de condições do meio (iluminação, temperatura, pH, oxigénio dissolvido, caudais de água etc.). Se os girinos não atingirem o estádio 51 nos 17 dias posteriores à fertilização, a causa poderá ter sido um excesso de tensão.

Criação e alimentação das larvas

13. Alimentam-se os girinos durante o período de pré-exposição [após o estádio 45/46 segundo Nieuwkoop e Faber, referência (8)] e todo o período de ensaio de 21 dias recorrendo, por exemplo, ao alimento comercial para girinos utilizado nos estudos de validação (ver também o apêndice 1) ou fornecendo-lhes outro alimento comprovadamente equiparável para efeitos do Ensaio de Metamorfose em Anfíbios. Durante o período de pré-exposição, é necessário adaptar cuidadosamente o regime alimentar às necessidades de desenvolvimento dos girinos. Ou seja, fornecem-se pequenas quantidades de alimento várias vezes por dia (pelo menos duas vezes) aos girinos recém-eclodidos. A fim de manter a qualidade da água e de não colmatar os filtros branquiais com partículas de alimentos e detritos, não deve fornecer-se uma quantidade excessiva de alimentos. Caso se recorra ao alimento para girinos utilizado nos estudos de validação, é necessário aumentar a ração diária em concomitância com o crescimento dos girinos, atingindo 30 mg diários por animal pouco antes do início do ensaio.

▼M6

Mostrou-se nos estudos de validação que este alimento disponível no comércio sustenta um crescimento e desenvolvimento adequados dos girinos de *Xenopus laevis*. Constituído por partículas finas, mantém-se em suspensão na coluna de água durante bastante tempo e é evacuado com o fluxo através do sistema. Por conseguinte, subdivide-se a quantidade diária de alimento e alimentam-se os girinos pelo menos duas vezes por dia. O regime correspondente a este alimento é descrito no quadro 1. Registam-se as quantidades de alimento fornecidas e a frequência com que o são. Este alimento pode ser fornecido seco ou sob a forma de uma solução de reserva em água de diluição. Prepara-se uma solução de reserva fresca de dois em dois dias e guarda-se esta solução a 4 °C.

Quadro 1.

Regime alimentar de girinos de *Xenopus laevis* com o alimento comercial para girinos utilizado nos estudos de validação, fornecido após a eclosão no Ensaio de Metamorfose em Anfíbios em condições de fluxo contínuo.

Dia do estudo	Dose de alimento (mg diários de alimento por animal)
0-4	30
5-7	40
8-10	50
11-14	70
15-21	80

Análises químicas

14. Antes de iniciar o estudo, é necessário avaliar a estabilidade do produto químico com base nas informações disponíveis sobre a solubilidade, degradabilidade e volatilidade do mesmo. No início do ensaio (dia 0) e uma vez por semana durante o ensaio, com um mínimo de quatro amostras, colhem-se amostras das soluções em estudo, para as análises químicas, em cada cuba replicada de cada concentração. Para verificar o funcionamento do sistema, recomenda-se igualmente que cada concentração a ensaiar seja analisada antes de se iniciar o ensaio, durante a preparação do sistema. Recomenda-se ainda que as soluções de reserva sejam analisadas sempre que sejam renovadas, especialmente se o volume da solução de reserva não fornecer a quantidade do produto químico necessária para a totalidade de cada período a que se reportam as colheitas de amostras de rotina. Se o produto químico for indetetável a algumas ou a todas as concentrações utilizadas no ensaio, é necessário analisar as soluções de reserva e registar os caudais através do sistema, a fim de calcular as concentrações nominais.

Modo de incorporação do produto químico em estudo

15. O método utilizado para introduzir no sistema o produto químico em estudo depende das propriedades físico-químicas do mesmo. Os produtos químicos hidrossolúveis podem ser dissolvidos em alíquotas da água utilizada no ensaio, numa concentração que permita a incorporação no sistema de fluxo contínuo à concentração de ensaio visada. Os produtos químicos líquidos à temperatura ambiente e pouco solúveis em água podem ser introduzidos no sistema recorrendo a métodos de saturação líquido-líquido. Os produtos químicos sólidos à temperatura ambiente e pouco solúveis em água podem ser introduzidos no sistema recorrendo a colunas de saturação com enchimento de fibra de vidro (7). Preferem-se sistemas de ensaio que não façam uso de um veículo, mas os diferentes produtos químicos possuem propriedades físico-químicas diversas, que presumivelmente exigirão abordagens distintas na preparação das soluções aquosas de exposição. As razões pelas quais se deve evitar a utilização de solventes ou de veículos são as seguintes: *i)* alguns solventes podem gerar eles próprios toxicidade e/ou reações endócrinas indesejadas ou inesperadas;

▼M6

ii) o ensaio de produtos químicos a concentrações superiores à correspondente hidrossolubilidade (como sucede frequentemente ao utilizar um solvente) pode falsear a determinação das concentrações efetivas; *iii)* a utilização de solventes nos ensaios mais longos pode resultar na formação significativa de biofilmes associados a atividade microbiana. No caso dos produtos químicos difíceis de ensaiar, pode, em último recurso, utilizar-se um solvente, devendo consultar-se o documento de orientações da OCDE sobre ensaios de toxicidade em meio aquático de substâncias e misturas difíceis (4) para determinar o melhor método. A escolha do solvente a utilizar depende das propriedades químicas do produto químico em causa. Entre os solventes que se revelaram adequados para ensaios de toxicidade em meio aquático contam-se a acetona, o etanol, o metanol, a dimetilformamida e o trietilenoglicol. Caso se utilize um solvente como veículo, as concentrações do solvente devem ser inferiores à concentração sem efeitos observáveis (NOEC) — o documento de orientações da OCDE recomenda que não seja ultrapassada a concentração de 100 µl/l, mas uma revisão recente recomenda concentrações de solventes da ordem dos 20 µl por litro de água de diluição (12). Caso se utilize um solvente como veículo, é necessário efetuar um ensaio de controlo adequado do solvente, além do ensaio dos outros grupos de controlo (água limpa). Se não for possível introduzir o produto químico através da água, quer devido às características físico-químicas (baixa solubilidade) do mesmo quer em virtude da reduzida disponibilidade do produto químico, pode ponderar-se a introdução por via alimentar. Realizaram-se alguns trabalhos preliminares sobre a exposição pela via alimentar, mas esta via não é habitualmente utilizada. A escolha do método deve ser justificada por via documental e ser objeto de uma verificação analítica.

Escolha das concentrações a utilizar no ensaio

Definição da concentração mais elevada

16. A concentração mais elevada a ensaiar é a mais baixa das seguintes concentrações: limite de solubilidade do produto químico em estudo, concentração máxima tolerada (CMT, no caso dos produtos químicos com efeitos tóxicos agudos) ou 100 mg/l.

17. Define-se a concentração máxima tolerada como a concentração mais elevada do produto químico em estudo que gera menos de 10 % de mortalidade aguda. Esta abordagem pressupõe a existência de dados empíricos de mortalidade devida a toxicidade aguda a partir dos quais se pode estimar a concentração máxima tolerada. A estimativa da concentração máxima tolerada pode ser inexata e, normalmente, requer uma certa capacidade de apreciação na matéria. Embora, tecnicamente, a utilização de modelos de regressão seja o melhor método de estimativa da concentração máxima tolerada, pode obter-se uma aproximação útil a partir de dados de toxicidade aguda utilizando o valor correspondente a 1/3 da CL_{50}. Todavia, pode dar-se o caso de não estarem disponíveis dados de toxicidade aguda para a espécie em estudo. Se assim for, pode realizar-se um ensaio de CL_{50} às 96 horas com girinos representativos (isto é, que se encontrem no mesmo estádio) dos ensaiados pelo Ensaio de Metamorfose em Anfíbios. Caso se disponha de dados relativos a outras espécies aquáticas (por exemplo estudos de CL_{50} em peixes ou noutras espécies de anfíbios), é igualmente possível, com base na experiência profissional, recorrer a uma extrapolação interespécies para estimar o valor provável da concentração máxima tolerada.

18. Se o produto químico não tiver efeitos tóxicos agudos e se mantiver solúvel acima de 100 mg/l, pode, como alternativa, considerar-se esta concentração a concentração mais elevada a ensaiar, dado que, normalmente, a mesma é considerada «praticamente não-tóxica».

▼M6

19. Embora não constituam o procedimento recomendado, podem utilizar-se métodos de renovação estáticos se os métodos de fluxo contínuo forem inadequados para atingir a concentração máxima tolerada. Caso se utilize um método de renovação estático, é necessário justificar por via documental a estabilidade do produto químico à concentração em causa, que deve respeitar o limite estabelecido nos critérios de desempenho. Recomenda-se que os períodos de renovação tenham a duração de 24 horas, não sendo aceitáveis períodos de renovação que se prolonguem por mais de 72 horas. No final de cada período de renovação, imediatamente antes desta, medem-se parâmetros de qualidade da água como o oxigénio dissolvido, a temperatura e o pH.

Gama de concentrações a ensaiar

20. Constitui requisito *mínimo* o ensaio de três concentrações e um ensaio de controlo da água limpa (assim como, se necessário, um ensaio de controlo do veículo). A relação entre as concentrações ensaiadas mais elevada e mais baixa deve ser, no mínimo, de aproximadamente uma ordem de grandeza. O fator que relaciona duas quaisquer doses consecutivas deve estar compreendido entre 0,1 (separação máxima) e 0,33 (separação mínima).

PROCEDIMENTO DE ENSAIO

Início e prosseguimento do ensaio

Dia 0

21. Inicia-se a exposição quando o número de girinos da população de reserva pré-exposição que atingiram o estádio de desenvolvimento 51, segundo Nieuwkoop e Faber (8), for suficiente, sendo a idade dos mesmos inferior ou igual a 17 dias após a fertilização. Tendo em vista a seleção dos animais a utilizar no ensaio, reúnem-se girinos saudáveis e de aparência normal da população de reserva numa cuba única com um volume adequado de água de diluição. Para se determinar o estádio de desenvolvimento, retiram-se os girinos um a um do tanque de reunião, utilizando uma pequena rede ou um pequeno coador, e transferem-se para uma célula de medição transparente (por exemplo uma placa de Petri de 100 mm) contendo água de diluição. Para se determinar o estádio de desenvolvimento, é preferível não utilizar anestesia, embora se possa anestesiar um a um os girinos, antes de os manipular, com uma solução a 100 mg/l de metanossulfonato de tricaína (por exemplo MS-222), adequadamente tamponada com bicarbonato de sódio (pH 7,0). Caso se recorra a anestesia, é necessário obter de um laboratório experiente a metodologia adequada para utilizar, por exemplo, o MS-222 e descrevê-la no relatório juntamente com os resultados do ensaio. Importa manipular os animais com cuidado durante esta transferência, a fim de minimizar a tensão associada à manipulação e de evitar causar-lhes alguma lesão.

22. Determina-se o estádio de desenvolvimento dos animais utilizando um microscópio binocular de dissecação. Para reduzir a variabilidade final do estádio de desenvolvimento, é importante que este estádio seja determinado com o máximo de exatidão possível. Segundo Nieuwkoop e Faber (8), o primeiro referencial de desenvolvimento para a seleção de organismos que se encontrem no estádio 51 é a morfologia das patas traseiras. Examinam-se as características morfológicas das patas traseiras ao microscópio. Embora deva consultar-se na íntegra o guia de Nieuwkoop e Faber (8) para obter informações completas sobre a determinação do estádio de desenvolvimento dos girinos, este pode ser determinado com fiabilidade com base em referenciais morfológicos claros. Pode utilizar-se o quadro seguinte para simplificar e normalizar o processo de determinação do estádio de desenvolvimento ao longo do estudo, identificando os referenciais morfológicos claramente associados aos diferentes estádios num processo de desenvolvimento normal.

▼M6

Quadro 2.

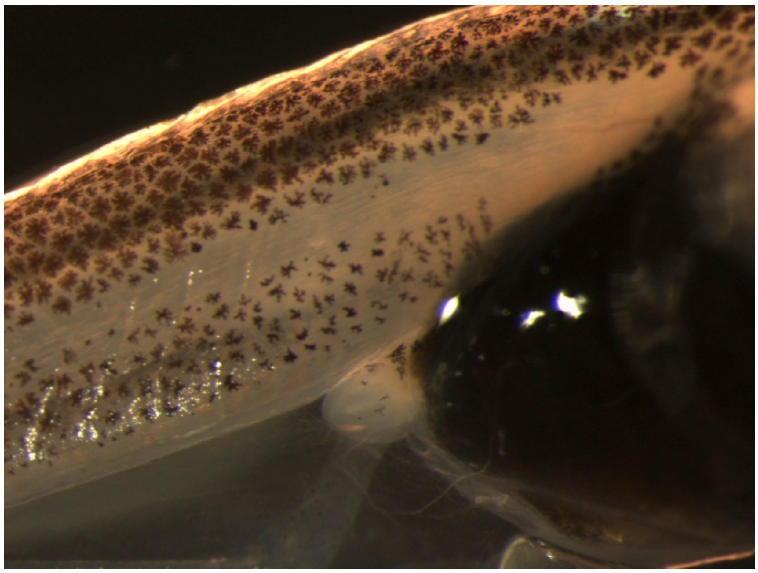
Referenciais morfológicos claros para determinação do estádio de desenvolvimento, segundo as orientações de Neuwkoop e Faber.

Referencial morfológico	Estádio de desenvolvimento															
	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66
Patas traseiras	X	X	X	X	X	X	X									
Patas dianteiras						X	X	X	X	X						
Estrutura craniofacial										X	X	X	X			
Morfologia do nervo olfativo											X	X	X			
Comprimento da cauda													X	X	X	X

23. Os girinos com os quais se inicia o ensaio devem estar no estádio 51. O referencial morfológico mais claro para determinação desse estádio de desenvolvimento é a morfologia das patas traseiras, mostrada na figura 1.

Figura 1.

Morfologia das patas traseiras num girino de *Xenopus laevis* no estádio de desenvolvimento 51.



24. Além da seleção em função do estádio de desenvolvimento, os animais a utilizar no ensaio também podem ser selecionados com base no seu tamanho. Para o efeito, mede-se no dia 0 o comprimento total do corpo (não a distância entre a boca e a cloaca) dos animais de uma subamostra de aproximadamente 20 girinos no estádio de desenvolvimento 51 segundo Neuwkoop e Faber. Uma vez calculado o comprimento médio do corpo dos animais deste subgrupo, podem ser estabelecidos um limite mínimo e um limite máximo para o comprimento do corpo dos animais a utilizar no ensaio, admitindo um desvio máximo de 3 mm em relação ao valor médio (os valores médios do comprimento do corpo dos girinos no estádio de desenvolvimento 51 variam entre 24,0 mm e 28,1 mm). No entanto, o estádio de desenvolvimento continua a ser o parâmetro principal para determinar a aptidão de um animal para o ensaio. Excluem-se do ensaio os girinos com lesões ou deformações manifestas.

▼M6

25. Os girinos que satisfaçam o critério do estádio de desenvolvimento *supra* conservam-se num tanque de água de criação limpa até ao termo do processo de determinação daquele estádio. Uma vez concluído este processo, distribuem-se aleatoriamente as larvas pelos tanques de exposição até que cada um contenha 20 larvas. Em seguida, verifica-se se há animais com aspeto anómalo (por exemplo lesões, natação anormal etc.) em algum tanque. Removem-se dos tanques de exposição os girinos claramente com aspeto pouco saudável e substituem-se por novas larvas retiradas do tanque de reunião.

Exames

26. Para informações mais aprofundadas sobre a conclusão do ensaio e o tratamento dos girinos, consultar o documento de orientações da OCDE sobre a histologia da tiroide em anfíbios (9).

Medições a efetuar no dia 7

27. No dia 7, retiram-se de cada tanque de ensaio cinco girinos escolhidos aleatoriamente em cada replicado. O processo de escolha aleatória utilizado deve garantir a cada organismo que participa no ensaio a mesma probabilidade de ser selecionado. Para isso, pode utilizar-se qualquer método de aleatorização, mas todos os girinos têm de ser capturados com uma rede. Os girinos não selecionados são repostos no tanque de origem; os girinos selecionados são eutanasiados sem sofrimento, por exemplo numa solução com a concentração de 150-200 mg/l de MS-222, adequadamente tamponada com bicarbonato de sódio para pH 7,0. Lavam-se com água os girinos eutanasiados e enxugam-se, determinando-se em seguida o peso de cada um com a aproximação de 1 mg. Determinam-se em cada girino o comprimento das patas traseiras, a distância entre a boca e a cloaca e o estádio de desenvolvimento (utilizando um microscópio binocular de dissecação).

Medições a efetuar no dia 21 (termo do ensaio)

28. No final do ensaio (dia 21), retiram-se os girinos restantes dos tanques de ensaio e eutanasiam-se sem sofrimento, como anteriormente indicado (por exemplo numa solução com a concentração de 150-200 mg/l de MS-222, adequadamente tamponada com bicarbonato de sódio para pH 7,0). Lavam-se os girinos com água e enxugam-se, determinando-se em seguida o peso de cada um com a aproximação de 1 mg. Determinam-se em cada girino o estádio de desenvolvimento, a distância entre a boca e a cloaca e o comprimento das patas traseiras.

29. Tendo em vista as avaliações histológicas, colocam-se todas as larvas durante 48 a 72 horas em fixador de Davidson, sob a forma de amostras de corpo inteiro ou sob a forma de amostras unicamente da cabeça, incluindo a mandíbula. Retira-se de cada tanque de replicação uma amostra de cinco girinos para a histopatologia. Dado que a espessura de células foliculares da tiroide depende do estádio de desenvolvimento (10), o método de amostragem mais adequado para as análises histológicas consiste em selecionar indivíduos que se encontrem, o mais possível, no mesmo estádio. A fim de selecionar girinos nessas condições, começa-se por determinar o estádio de desenvolvimento de cada larva antes da seleção de larvas e do tratamento posterior das mesmas para recolha de dados e conservação. É necessário proceder deste modo porque as diferenças normais de desenvolvimento traduzem-se na ocorrência de diferentes estádios de desenvolvimento em cada tanque de replicação.

30. Sempre que possível, os animais selecionados para a histopatologia (n = 5 de cada replicado) devem corresponder à mediana dos estádios de desenvolvimento em que se encontram os girinos de controlo (todos os replicados de controlo reunidos). Nos tanques de replicação em que existam mais de cinco larvas no estádio adequado, selecionam-se aleatoriamente cinco delas.

▼M6

31. Nos tanques de replicação com menos de cinco larvas no estádio adequado, selecionam-se aleatoriamente indivíduos no estádio de desenvolvimento imediatamente inferior ou superior, de modo a completar uma amostra de cinco larvas por replicado. De preferência, a decisão de incorporar na amostra larvas do estádio de desenvolvimento imediatamente inferior ou superior deve basear-se numa avaliação global da distribuição por estádios nos grupos de controlo e nos grupos expostos ao produto químico em estudo. Ou seja, se à exposição ao produto químico em estudo estiver associado um atraso de desenvolvimento, as larvas adicionais a incorporar na amostra devem provir do estádio imediatamente inferior. Em contrapartida, se à exposição ao produto químico em estudo estiver associada uma aceleração do desenvolvimento, as larvas adicionais a incorporar na amostra devem provir do estádio imediatamente superior.

32. Caso a exposição ao produto químico em estudo altere fortemente o desenvolvimento dos girinos, pode não haver nenhuma sobreposição entre a distribuição por estádios nos grupos expostos ao produto químico em estudo e a mediana calculada dos estádios de desenvolvimento dos girinos de controlo. Unicamente nesses casos, modifica-se o processo de seleção, utilizando um estádio diferente da mediana dos estádios em que se encontram os girinos de controlo para estabelecer uma correspondência com o estádio em que se encontram as larvas que integram as amostras destinadas à histopatologia da tiroide. Se os estádios forem indeterminados (no caso de assincronia), selecionam-se aleatoriamente para as análises histológicas cinco girinos de cada replicado. As razões que tiverem justificado a incorporação nas amostras de larvas cujo estádio de desenvolvimento não seja equivalente à mediana dos estádios de desenvolvimento em que se encontram os girinos de controlo devem constar do relatório.

Determinação dos parâmetros biológicos

33. Durante a fase de exposição de 21 dias, medem-se os parâmetros principais nos dias 7 e 21, mas é necessário examinar diariamente os animais que participam no ensaio. O quadro 3 resume os parâmetros a medir e o momento em que os exames correspondentes devem ser efetuados. Os documentos de orientações da OCDE (9) contêm informações mais pormenorizadas sobre as técnicas de medição dos parâmetros apicais e de avaliação histológica.

Quadro 3.

Momento da realização dos exames correspondentes ao parâmetros principais do Ensaio de Metamorfose em Anfíbios.

Parâmetro apical	Diariamente	Dia 7	Dia 21
— Mortalidade	·		
— Estádio de desenvolvimento		·	·
— Comprimento das patas traseiras		·	·
— Distância entre a boca e a cloaca		·	·
— Peso corporal húmido		·	·
— Histologia da tiroide			·

▼M6

Parâmetros apicais

34. O estádio de desenvolvimento, o comprimento das patas traseiras, a distância entre a boca e a cloaca e o peso corporal húmido constituem os parâmetros apicais do Ensaio de Metamorfose em Anfíbios. Descrevem-se resumidamente a seguir. Os documentos de orientações referidos contêm informações técnicas suplementares sobre a recolha destes dados, incluindo os métodos recomendados de análise assistida por computador.

Estádio de desenvolvimento

35. Determina-se o estádio de desenvolvimento dos girinos de *Xenopus laevis* com base nos critérios estabelecidos por Nieuwkoop e Faber (8) para classificar esses estádios. Utilizam-se os dados relativos ao estádio de desenvolvimento para determinar se o desenvolvimento é acelerado, assíncrono ou retardado ou não é afetado. Determinam-se as acelerações e os atrasos de desenvolvimento por comparação da mediana dos estádios atingidos pelos grupos expostos e pelos grupos de controlo. Considera-se que existe uma assincronia de desenvolvimento quando os tecidos examinados não apresentam nenhuma anomalia ou malformação, mas se verifica um desfasamento relativo da morfogénese ou do desenvolvimento entre os diferentes tecidos do girino examinado.

Comprimento das patas traseiras

36. A diferenciação e o crescimento das patas traseiras são regulados pelas hormonas da tiroide e constituem referenciais de desenvolvimento importantes, já utilizados na determinação do estádio de desenvolvimento. O desenvolvimento das patas traseiras é utilizado como elemento qualitativo na determinação do estádio de desenvolvimento, mas neste item é considerado um parâmetro quantitativo. Mede-se, portanto, o parâmetro comprimento das patas traseiras para detetar efeitos no eixo tiróideo (figura 2). Por razões de coerência, mede-se o comprimento da pata traseira esquerda. Determina-se este comprimento nos dias 7 e 21 do ensaio. No dia 7, a medição deste comprimento não oferece dificuldades, como se ilustra na figura 2. Porém, no dia 21, a medição é mais complicada, devido às curvas existentes nas patas. As medições do comprimento das patas traseiras realizadas no dia 21 são, portanto, efetuadas a partir da parede corporal, ao longo da linha média do membro e absorvendo todos os desvios angulares. Mesmo que as alterações verificadas no comprimento das patas traseiras ao dia 7 já não sejam identificáveis ao dia 21, não deixam de ser consideradas um indicador de atividade potencial sobre a tiroide. Utilizando *software* de análise de imagem, medem-se estes comprimentos em fotografias digitalizadas, conforme de explica no documento de orientações da OCDE sobre a histologia da tiroide em anfíbios (9).

Comprimento e peso húmido do corpo

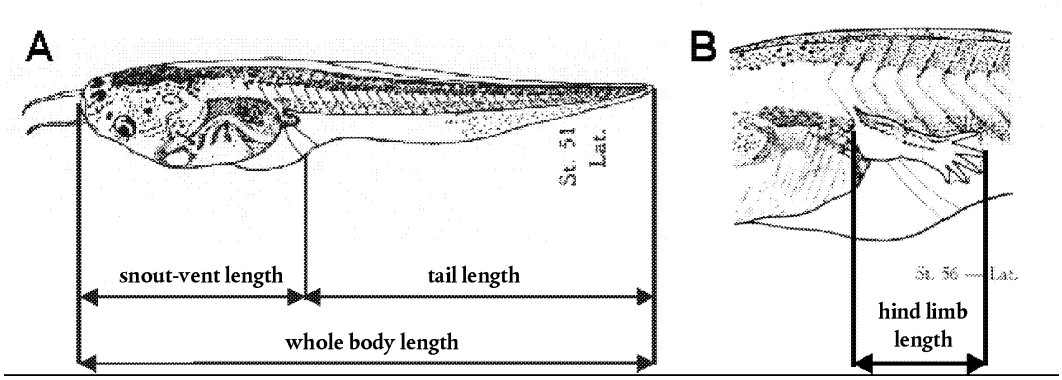
37. O protocolo do ensaio compreende a determinação da distância entre a boca e a cloaca (figura 2) e do peso húmido para avaliar eventuais efeitos do produto químico em estudo na taxa de crescimento dos girinos, comparativamente ao grupo de controlo, sendo ambos úteis na deteção de toxicidade generalizada do produto químico em estudo. Uma vez que a eliminação da água à superfície dos girinos para a realização das pesagens pode causar-lhes tensão e lesionar-lhes a pele, as medições realizam-se, no dia 7, na subamostra de girinos então constituída, no final do ensaio (dia 21), em todos os girinos restantes. Por razões de coerência, considera-se para extremo caudal da medição o lado cranial da cloaca.

38. A distância entre a boca e a cloaca que serve para avaliar o crescimento dos girinos é ilustrada na figura 2.

▼M6

Figura 2.

Tipos de medições de comprimento no corpo (A) e medição do comprimento das patas traseiras (B), em girinos de *Xenopus laevis* (1).



Histologia da tiroide

39. Embora o estádio de desenvolvimento e o comprimento das patas traseiras sejam parâmetros importantes para avaliar alterações do desenvolvimento metamórfico causadas pela exposição, não pode considerar-se que, por si só, um atraso de desenvolvimento seja indicador de atividade antitiróidea. Algumas alterações só são observáveis através de análises histopatológicas de rotina. Entre os critérios de diagnóstico contam-se a atrofia/hipertrofia da tiroide, a hipertrofia ou hiperplasia das células foliculares da tiroide e os seguintes critérios qualitativos adicionais: superfície do lúmen folicular, qualidade do coloide e espessura/forma das células foliculares da tiroide. Indicam-se no relatório os graus de intensidade (4 níveis). A referência (9) (*Amphibian Metamorphosis Assay: Part 1 — Technical guidance for morphologic sampling and histological preparation* e *Amphibian Metamorphosis Assay: Part 2 — Approach to reading studies, diagnostic criteria, severity grading and atlas*) contém informações relativas à obtenção e ao tratamento de amostras destinadas a análise histológica e sobre a realização de análises histológicas a amostras de tecidos. Antes de efetuarem análises e avaliações histológicas da tiroide, os laboratórios que realizem o ensaio pela primeira vez (ou nas primeiras vezes que o realizarem) devem aconselhar-se com patologistas experientes a fim de obterem formação neste domínio. A ocorrência de alterações importantes e manifestas dos parâmetros apicais que indiciem assincronias ou acelerações do desenvolvimento podem dispensar a realização de análises histopatológicas da tiroide. Todavia, a ausência de alterações morfológicas manifestas ou a ocorrência de atrasos de desenvolvimento justifica a realização das análises.

Mortalidade

40. Verifica-se diariamente em todos os tanques de ensaio se neles morreram girinos e regista-se a mortalidade por tanque. Registam-se igualmente a data, a concentração e o número de tanque correspondentes a cada constatação de mortalidade. Logo que sejam detetados, retiram-se os animais mortos do tanque de ensaio. Taxas de mortalidade superiores a 10 % podem indiciar condições experimentais inadequadas ou efeitos tóxicos do produto químico em estudo.

Exames adicionais

41. Registam-se os casos de comportamento anormal e de lesões e malformações visíveis por exame macroscópico. Registam-se igualmente a data, a concentração e o número de tanque correspondentes a cada constatação de comportamento anormal ou de lesões ou malformações visíveis por exame

▼M6

macroscópico. O comportamento normal dos girinos caracteriza-se pela suspensão dos mesmos na coluna de água com a cauda a um nível superior à cabeça, pelo batimento rítmico regular da barbatana caudal, por emersões periódicas, pelos opérculos em movimento e pela reação a estímulos. Constituem comportamentos anormais, por exemplo, a flutuação à superfície, a imobilização no fundo do tanque, natação invertida ou irregular, falta de atividade à superfície e ausência de reação aos estímulos. Registam-se ainda as diferenças importantes de consumo de alimentos entre grupos expostos ao produto químico em estudo. Entre as lesões ou malformações visíveis por exame macroscópico contam-se, nomeando apenas algumas, anomalias morfológicas (por exemplo deformações nos membros), lesões hemorrágicas e infeções bacterianas ou fúngicas. A determinação destes casos é qualitativa, efetua-se por comparação com os animais dos grupos de controlo e a ocorrência dos mesmos equipara-se à de sinais clínicos de doença ou de tensão. Se a ocorrência ou a taxa de ocorrência destes casos nos tanques expostos ao produto químico em estudo for superior à verificada nos grupos de controlo, fica comprovada a existência de toxicidade manifesta.

DADOS E RELATÓRIOS

Recolha de dados

42. Todos os sistemas (manuais ou eletrónicos) de recolha de dados devem ser conformes com as boas práticas de laboratório. Os dados a obter no estudo são os seguintes:

Produto químico em estudo

— caracterização do produto químico: propriedades físico-químicas; informações sobre estabilidade e biodegradabilidade;

— informações e dados sobre o produto químico: método e frequência de preparação das diluições. Entre estas informações contam-se as concentrações reais e nominais do produto químico em estudo e, nos casos em que se justifique, de produtos químicos não-parentais. As medições do produto químico em estudo podem incidir tanto nas soluções de reserva como nas soluções ensaiadas;

— solvente (se não for água): justificação da escolha e caracterização do solvente (natureza, concentração utilizada).

Condições de realização do ensaio

— registos operacionais: trata-se de observações relativas ao funcionamento do sistema de ensaio, bem como à infraestrutura e ao ambiente de apoio. Os registos abrangem, habitualmente, a temperatura ambiente, a temperatura de ensaio, o fotoperíodo, o estado dos componentes cruciais do sistema de exposição (por exemplo bombas, contadores de ciclos e manómetros), os caudais, os níveis de água, a renovação dos frascos de soluções de reserva e a alimentação fornecida. Os parâmetros gerais de qualidade de água incluem o pH, o oxigénio dissolvido, a condutividade, o iodo total, a alcalinidade e a dureza;

— desvios do método de ensaio: contempla todas as informações sobre desvios do método de ensaio e a descrição dos mesmos.

Resultados

— exames e dados biológicos: compreendem o exame diário da mortalidade, do consumo de alimentos, de comportamentos anormais de natação, dos casos de letargia, das perdas de equilíbrio, das malformações, das lesões etc. Exames a intervalos predefinidos e dados coligidos nesse âmbito: compreendem o estádio de desenvolvimento, o comprimento das patas traseiras, a distância entre a boca e a cloaca e o peso húmido;

▼M6

— técnicas de análise estatística utilizadas e justificação da escolha; resultados da análise estatística, de preferência sob a forma de quadros;

— dados histológicos: compreendem a descrição dos mesmos, assim como o grau de intensidade e a taxa de incidência das observações, como se explica no documento de orientações sobre histopatologia;

— observações *ad hoc*: compreendem as descrições do estudo que não se enquadram nas outras categorias referidas.

Relatório dos dados

43. O apêndice 2 compreende quadros de recolha diária de dados que podem servir de orientação para a recolha de dados brutos e para o cálculo dos parâmetros estatísticos de síntese. Inclui igualmente quadros destinados a facilitar a comunicação de resumos dos dados correspondentes aos diversos parâmetros. Compreende ainda quadros para as avaliações histológicas.

Especificações e aceitabilidade/validade do ensaio

44. Em geral, grandes desvios do método de ensaio geram dados inaceitáveis, que não cabe interpretar nem deles redigir relatório. Elaboraram-se, portanto, os critérios de orientação enunciados no quadro 4 para determinar a qualidade do ensaio realizado e dos resultados gerais obtidos para os organismos de controlo.

Quadro 4

Especificações do Ensaio de Metamorfose em Anfíbios.

Critério	Limite de aceitabilidade
Concentrações ensaiadas	Variabilidade, ao longo dos 21 dias do ensaio, da concentração de ensaio medida ≤ 20 %
Mortalidade no grupo de controlo	≤ 10 %; em nenhum dos replicados de controlo morrem mais de 2 girinos
Valor mínimo da mediana dos estádios de desenvolvimento em que se encontram os girinos de controlo no final do ensaio	57
Dispersão do estádio de desenvolvimento no grupo de controlo	Os indivíduos do décimo e do nonagésimo percentil da distribuição do estádio de desenvolvimento não diferem de mais de 4 estádios
Oxigénio dissolvido	≥ 40 % da saturação com ar (*)
pH	Mantém-se entre 6,5 e 8,5. As diferenças entre replicados e entre níveis de exposição não excedem 0,5
Temperatura da água	22 °C ± 1 °C; as diferenças entre replicados e entre níveis de exposição não excedem 0,5 °C.
Concentrações ensaiadas que não geram toxicidade manifesta	≥ 2
Função dos replicados	Fica comprometida a função no ensaio de não mais de dois replicados

▼M6

Critério	Limite de aceitabilidade
Condições especiais relativas à utilização de um solvente	Caso se utilize um solvente, constitui-se um grupo de controlo do solvente e um grupo de controlo da água limpa, sendo os resultados correspondentes inseridos no relatório
	As diferenças com significância estatística entre o grupo de controlo do solvente e o grupo de controlo da água têm um tratamento específico. Figuram adiante mais informações.
Condições especiais relativas à utilização de um sistema de renovação estático	Figuram no relatório os resultados de análises químicas representativas efetuadas antes e depois da renovação
	Mede-se o teor de amoníaco imediatamente antes da renovação
	Medem-se imediatamente antes da renovação todos os parâmetros de qualidade da água indicados no quadro 1 do apêndice 1
	O período de renovação não se prolonga por mais de 72 horas
	Programa de alimentação adequado (50 % da ração diária constituídos por alimento comercial para girinos)

(*) Para arejar a água podem ser utilizados borbulhadores. Recomenda-se que sejam regulados a níveis que não gerem tensões desnecessárias nos girinos.

Validade do ensaio

45. Para que um teste possa ser considerado aceitável/válido, é necessário que estejam preenchidos os seguintes requisitos:

Condições de validade de um ensaio para que possa considerar-se que a atividade na tiroide deu resultado negativo:

1) A mortalidade não excede 10 % em nenhum grupo exposto ao produto químico em estudo (nem no grupo de controlo). Em nenhum replicado a mortalidade excede três girinos; caso contrário, considera-se que o replicado ficou comprometido.

2) Estão disponíveis para as análises pelo menos dois níveis de exposição, não estando comprometido nenhum dos quatro replicados (de cada um deles).

3) Estão disponíveis para as análises pelo menos dois níveis de exposição que não geram toxicidade manifesta.

Condições de validade de um ensaio para que possa considerar-se que a atividade na tiroide deu resultado positivo:

1) A mortalidade máxima admissível no grupo de controlo é de dois girinos por replicado.

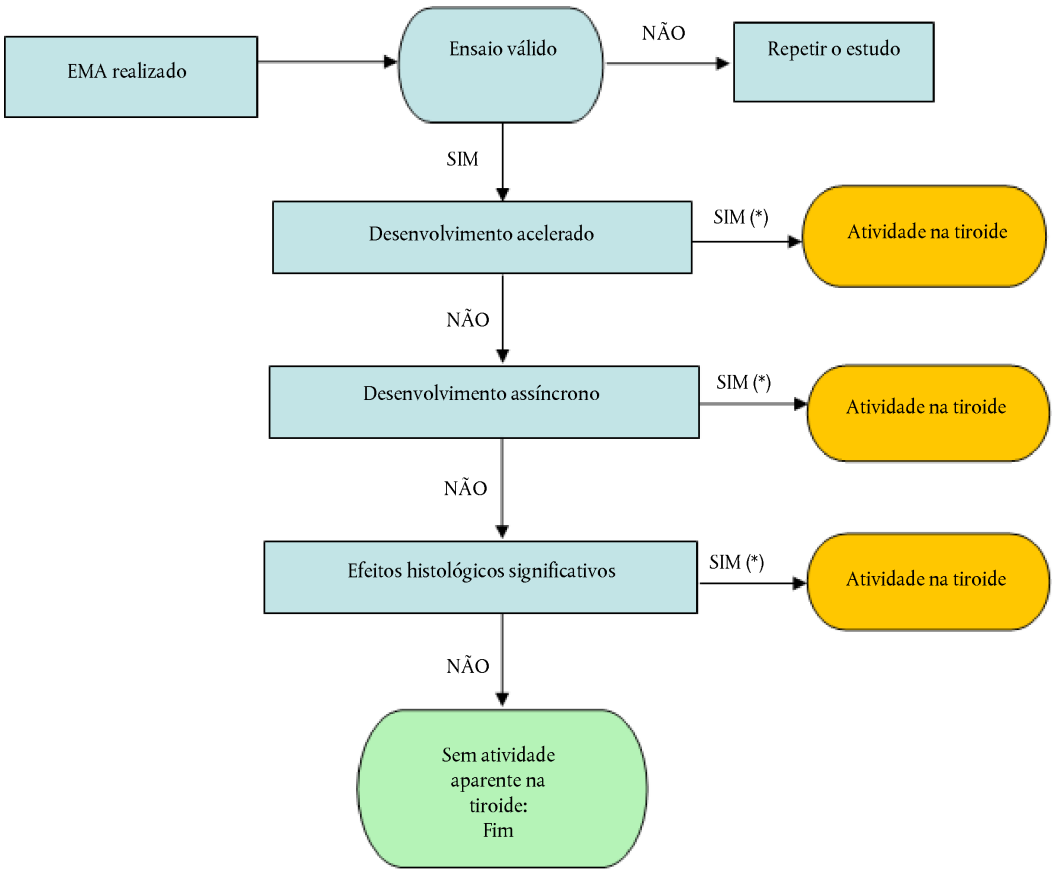
Fluxograma de decisão para a condução do Ensaio de Metamorfose em Anfíbios

46. Elaborou-se para o Ensaio de Metamorfose em Anfíbios um fluxograma de decisão destinado a facilitar a condução do bioensaio e a interpretação dos resultados deste (ver o fluxograma que constitui a figura 3). Essencialmente, a lógica de decisão baseia-se numa ponderação dos parâmetros, sendo esta elevada no caso do desenvolvimento acelerado, do desenvolvimento assíncrono e da histopatologia da tiroide e mais reduzida no caso do desenvolvimento retardado, da distância entre a boca e a cloaca e do peso corporal húmido (estes últimos parâmetros suscetíveis de também serem afetados pela toxicidade generalizada).

▼M6

Figura 3.

Fluxograma de decisão para a condução do Ensaio de Metamorfose em Anfíbios (EMA).



* Algumas autoridades reguladoras podem exigir a histologia, apesar da ocorrência de desenvolvimento acelerado ou assíncrono significativo. A fim de determinar que parâmetros é necessário avaliar, a entidade que irá realizar o ensaio deve consultar as autoridades competentes antes de lhe dar início.

Desenvolvimento acelerado (determinado com base no estádio de desenvolvimento, na distância entre a boca e a cloaca e no comprimento das patas traseiras)

47. Tanto quanto se sabe, só ocorre desenvolvimento acelerado devido a efeitos relacionados com as hormonas da tiroide. Pode tratar-se de efeitos nos tecidos periféricos, nomeadamente devido a interação direta com os recetores das hormonas tiróideas (como a T4), ou de efeitos que alteram os níveis de hormonas tiróideas em circulação. Em qualquer dos casos, considera-se existir indício suficiente de atividade do produto químico na tiroide. Avalia-se o desenvolvimento acelerado de uma de duas maneiras. A primeira passa pela avaliação do estádio de desenvolvimento geral segundo o método normalizado de Nieuwkoop e Faber (8). A segunda passa pela quantificação de determinadas características morfológicas, como o comprimento das patas traseiras, ao sétimo e ao vigésimo primeiro dias, critério que reage positivamente a efeitos agonistas nos recetores das hormonas tiróideas. Caso se detete uma aceleração com significância estatística do desenvolvimento ou do comprimento das patas traseiras, conclui-se que o ensaio revela atividade do produto químico na tiroide.

▼**M6**

48. A avaliação da ocorrência de desenvolvimento acelerado, em relação à população de controlo, nos animais ensaiados baseia-se nos resultados de análises estatísticas realizadas aos seguintes quatro parâmetros:

— comprimento das patas traseiras (normalizado em função da distância entre a boca e a cloaca) ao dia 7 do ensaio;

— comprimento das patas traseiras (normalizado em função da distância entre a boca e a cloaca) ao dia 21 do ensaio;

— estádio de desenvolvimento ao dia 7 do ensaio;

— estádio de desenvolvimento ao dia 21 do ensaio.

49. Realizam-se as análises estatísticas do comprimento das patas traseiras com base em comprimentos medidos na pata esquerda. Normaliza-se o comprimento das patas traseiras tomando em consideração a razão entre esse comprimento e a distância entre a boca e a cloaca de cada indivíduo. Comparam-se em seguida as médias dos valores normalizados obtidos para os diversos níveis de exposição. Um aumento com significância estatística do valor médio do comprimento das patas traseiras (normalizado) num grupo exposto ao produto químico em estudo, comparativamente ao grupo de controlo, ao dia 7 e/ou ao dia 21 do ensaio, revela aceleração do desenvolvimento (ver o apêndice 3).

50. Realizam-se as análises estatísticas do estádio de desenvolvimento com base na determinação desses estádios de acordo com os critérios morfológicos descritos por Nieuwkoop e Faber (8). A deteção, numa análise multiquantal, de um aumento com significância estatística dos valores do estádio de desenvolvimento num grupo exposto ao produto químico em estudo, comparativamente ao grupo de controlo, ao dia 7 e/ou ao dia 21 do ensaio, revela aceleração do desenvolvimento.

51. No Ensaio de Metamorfose em Anfíbios, considera-se que um efeito com significância estatística em qualquer dos quatro parâmetros referidos é suficiente para se concluir pela ocorrência de desenvolvimento acelerado. Ou seja, a deteção de efeitos com significância estatística no comprimento das patas traseiras num determinado momento não tem de ser corroborada por efeitos com significância estatística no comprimento das patas traseiras noutro momento do ensaio nem por efeitos com significância estatística no estádio de desenvolvimento no mesmo momento determinado. Analogamente, a deteção de efeitos com significância estatística no estádio de desenvolvimento num determinado momento não tem de ser corroborada por efeitos com significância estatística no estádio de desenvolvimento noutro momento do ensaio nem por efeitos com significância estatística no comprimento das patas traseiras no mesmo momento determinado. Todavia, a deteção de efeitos com significância estatística em mais do que um parâmetro reforça as provas reunidas a favor da ocorrência de desenvolvimento acelerado.

Desenvolvimento assíncrono (determinado com base em critérios de estádio de desenvolvimento)

52. Um desenvolvimento assíncrono caracteriza-se por um desfasamento relativo da morfogénese ou do desenvolvimento entre os diferentes tecidos do girino examinado. A impossibilidade de determinar claramente o estádio de desenvolvimento de um organismo com base na série de parâmetros morfológicos considerados típicos de cada estádio é reveladora de desenvolvimento assíncrono dos tecidos no processo de metamorfose. O desenvolvimento assíncrono constitui um indicador de atividade na tiroide. Os únicos modos de ação conhecidos causadores de desenvolvimento assíncrono manifestam-se através dos efeitos do produto químico na ação periférica das hormonas tiróideas e/ou no metabolismo dessas hormonas nos tecidos em desenvolvimento, como se observa com os inibidores da desiodinase.

▼**M6**

53. A avaliação da ocorrência de desenvolvimento assíncrono nos animais sujeitos ao ensaio baseia-se no exame morfológico macroscópico dos mesmos nos dias 7 e 21 do estudo, comparativamente à população de controlo.

54. A descrição do desenvolvimento normal do *Xenopus laevis* segundo Nieuwkoop e Faber (8) permite identificar a ordem sequencial normal de remodelação dos tecidos. O termo «desenvolvimento assíncrono» refere-se, especificamente, aos desvios no desenvolvimento morfológico macroscópico dos girinos que impedem a determinação definitiva de um estádio de desenvolvimento com base nos critérios de Nieuwkoop e Faber (8), devido ao facto de haver referenciais morfológicos fundamentais que revelam características indicadoras de estádios diferentes.

55. Como está implícito no termo «desenvolvimento assíncrono», apenas se consideram os casos que evidenciem desvios no progresso da remodelação de determinados tecidos comparativamente ao progresso evidenciado na remodelação de outros tecidos. Entre os fenótipos clássicos, contam-se atrasos ou ausência total na emergência das patas dianteiras, em contraste com o desenvolvimento normal ou acelerado dos tecidos das patas traseiras e da cauda, ou a reabsorção precoce das guelras, comparativamente ao estádio de morfogénese das patas traseiras ou de reabsorção da cauda. Considera-se que um animal evidencia desenvolvimento assíncrono se não for possível classificá-lo em nenhum estádio, por não satisfazer a maior parte dos critérios de referenciais de desenvolvimento correspondentes a cada estádio definido por Nieuwkoop e Faber (8), ou se uma ou mais características fundamentais evidenciarem um atraso ou uma aceleração extremos (por exemplo cauda completamente absorvida, mas patas dianteiras ausentes). Esta avaliação é qualitativa e assenta no exame da totalidade dos referenciais caracterizadores enumerados por Nieuwkoop e Faber (8). Não é necessário conservar registo do estádio de desenvolvimento correspondente aos vários referenciais caracterizadores dos animais examinados. Aos animais registados com desenvolvimento assíncrono não é atribuído nenhum estádio de desenvolvimento segundo Nieuwkoop e Faber (8).

56. Por conseguinte, um critério central para a atribuição da classificação «desenvolvimento assíncrono» a casos de desenvolvimento morfológico anormal é a ocorrência de desfasamentos relativos na remodelação e morfogénese dos tecidos, sem que a morfologia dos tecidos afetados seja abertamente anómala. Um exemplo ilustrativo desta interpretação das anomalias morfológicas macroscópicas é que um atraso na morfogénese das patas traseiras, comparativamente ao desenvolvimento de outros tecidos, satisfaz o critério de «desenvolvimento assíncrono», ao passo que casos em que o animal simplesmente não possua patas traseiras, evidencie anomalias digitais (por exemplo ectrodactilia ou polidactilia) ou tenha qualquer outra malformação manifesta das patas não são considerados «desenvolvimento assíncrono».

57. Neste contexto, os principais referenciais morfológicos cuja coordenação, em termos de progresso metamórfico, importa avaliar compreendem a morfogénese das patas traseiras, a morfogénese das patas dianteiras, a emergência das patas dianteiras, o estádio de reabsorção da cauda (em especial a reabsorção da barbatana caudal) e a morfologia da cabeça (tamanho das guelras, estádio de reabsorção das guelras, morfologia da mandíbula, protrusão da cartilagem de Meckel etc.).

58. Podem ocorrer diversos fenótipos morfológicos macroscópicos, consoante o modo de ação do produto químico em causa. Entre os fenótipos clássicos, contam-se atrasos ou ausência total na emergência das patas dianteiras, em contraste com o desenvolvimento normal ou acelerado dos tecidos das patas traseiras e da cauda, ou a reabsorção precoce das guelras, comparativamente à remodelação das patas traseiras e da cauda.

▼M6

Histopatologia

59. Se o produto químico em estudo não apresentar toxicidade manifesta e não acelerar o desenvolvimento nem causar desenvolvimento assíncrono, procede-se à avaliação histopatológica da tiroide com base no documento de orientações adequado (9). Na ausência de toxicidade, os atrasos de desenvolvimento constituem forte indicador de atividade antitiróidea, pese embora a análise do estádio de desenvolvimento ser menos sensível, e menos eficaz na orientação do diagnóstico, do que a análise histopatológica da tiroide. Neste caso, é, portanto, necessário efetuar análises histopatológicas à tiroide. Foi demonstrada a ocorrência de efeitos na histologia da tiroide sem correspondência em efeitos no desenvolvimento. Caso se detetem alterações na histopatologia da tiroide, considera-se que o produto químico tem atividade na tiroide. Caso não se observem atrasos de desenvolvimento nem lesões histológicas na tiroide, considera-se que o produto químico não tem atividade na tiroide. A razão desta decisão é que a tiroide está sob a influência da TSH e que qualquer produto químico que altere as hormonas tiróideas em circulação em grau suficiente para alterar a secreção de TSH provocará alterações histopatológicas na tiroide. Há vários modos e mecanismos de alteração das hormonas tiróideas em circulação. Por conseguinte, embora o nível de hormonas tiróideas constitua um indicador de efeitos na tiroide, é insuficiente para determinar o modo ou mecanismo de reação subjacente.

60. Uma vez que este parâmetro não se presta à aplicação de métodos estatísticos básicos, a associação de um efeito à exposição a um produto químico assenta necessariamente no parecer especializado de um patologista.

Desenvolvimento retardado (determinado com base no estádio de desenvolvimento, no comprimento das patas traseiras, no peso corporal e na distância entre a boca e a cloaca)

61. Podem ocorrer atrasos de desenvolvimento através de mecanismos antitiróideos ou de toxicidade indireta. A conjugação de atrasos de desenvolvimento moderados com sinais manifestos de toxicidade constitui provavelmente indício de um efeito tóxico inespecífico. Para reduzir a probabilidade de falsos positivos, a avaliação da toxicidade não associada à tiroide é elemento essencial do ensaio. Uma mortalidade excessiva constitui indicação óbvia da ocorrência de outros mecanismos tóxicos. Analogamente, uma redução moderada do crescimento, determinada com base no peso corporal e/ou na distância entre a boca e a cloaca, também sugere toxicidade não associada à tiroide. Observa-se frequentemente um aumento evidente do crescimento por ação de produtos químicos que perturbam o desenvolvimento normal, pelo que a presença de animais de maior porte não constitui necessariamente um indicador de toxicidade não associada à tiroide. A ocorrência de toxicidade na tiroide não pode, portanto, ser determinada unicamente com base no crescimento. A existência de atividade na tiroide deve, sim, ser determinada com base na conjugação do crescimento com o estádio de desenvolvimento e a histopatologia da tiroide. Para se determinar a existência de toxicidade manifesta recorre-se igualmente a outros parâmetros, como a ocorrência de edemas, lesões hemorrágicas ou letargia, um consumo reduzido de alimentos, comportamentos natatórios erráticos ou alterados etc. Se todas as concentrações ensaiadas gerarem sinais de toxicidade manifesta, reavalia-se a concentrações inferiores o produto químico em estudo, antes de tirar conclusões sobre a potencial atividade ou inatividade do mesmo na tiroide.

62. Na ausência de outros sinais de toxicidade manifesta, a ocorrência de atrasos de desenvolvimento com significância estatística é reveladora de que o produto químico tem atividade (antagonista) na tiroide. Na ausência de uma resposta estatística inequívoca, esta conclusão pode ser corroborada pelos resultados da histopatologia da tiroide.

▼M6

Análises estatísticas

63. De preferência, as análises estatísticas dos dados realizam-se pelos processos descritos no documento *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application* (11). No que respeita aos parâmetros quantitativos contínuos (comprimento das patas traseiras, distância entre a boca e a cloaca e peso húmido) cuja relação dose-resposta seja monótona, aplica-se o teste de Jonckheere-Terpstra de forma regressiva para determinar se existe algum efeito com significância estatística da exposição ao produto químico.

64. No caso dos parâmetros contínuos cuja relação dose-resposta não seja monótona, avalia-se a normalidade (de preferência por meio do teste de Shapiro-Wilk ou do teste de Anderson-Darling) e a homogeneidade da variância (recorrendo preferencialmente ao teste de Levene) dos dados. Os dados a utilizar em ambos os testes são os resíduos de uma análise de variância (ANOVA). Embora seja preferível realizar os testes formais de normalidade e de homogeneidade da variância, estes podem substituir-se pela apreciação de um especialista na matéria. Em caso de não-normalidade ou de heterogeneidade da variância, deve recorrer-se a uma transformação normalizadora e estabilizadora da variância. Se a distribuição dos dados for normal com variância homogénea (eventualmente após a transformação a que se aludiu), recorre-se ao teste de Dunnett para determinar se existe algum efeito com significância estatística da exposição ao produto químico. Se a distribuição dos dados for normal com variância heterogénea (eventualmente após a transformação a que se aludiu), recorre-se ao teste de Tamhane-Dunnett (ou T3) ou ao teste U de Mann-Whitney-Wilcoxon para determinar se existe algum efeito com significância estatística da exposição ao produto químico. Caso não se consiga realizar nenhuma transformação normalizadora, recorre-se ao teste U de Mann-Whitney-Wilcoxon, com aplicação do ajustamento de Bonferroni-Holm aos valores p, para determinar se existe algum efeito com significância estatística da exposição ao produto químico. Aplica-se o teste de Dunnett independentemente de qualquer teste F de análise de variância e o teste de Mann-Whitney independentemente de qualquer teste global de Kruskall-Wallis.

65. Não é de esperar mortalidade com significância estatística. Porém, se os dados traduzirem uma relação dose-resposta monótona, recorre-se ao teste de Cochran-Armitage regressivo para avaliar a mortalidade. Caso contrário, recorre-se ao teste exato de Fisher com ajustamento de Bonferroni-Holm.

66. Para determinar se existe algum efeito com significância estatística no estádio de desenvolvimento, resultante da exposição ao produto químico, aplica-se o teste de Jonckheere-Terpstra de forma regressiva às medianas dos replicados. Uma técnica alternativa para determinar se existe algum efeito desse tipo — e preferível, pois tem em conta variações do perfil de distribuição — consiste em aplicar o teste de Jonckheere com análise multiquantal entre o 20.º e o 80.º percentis.

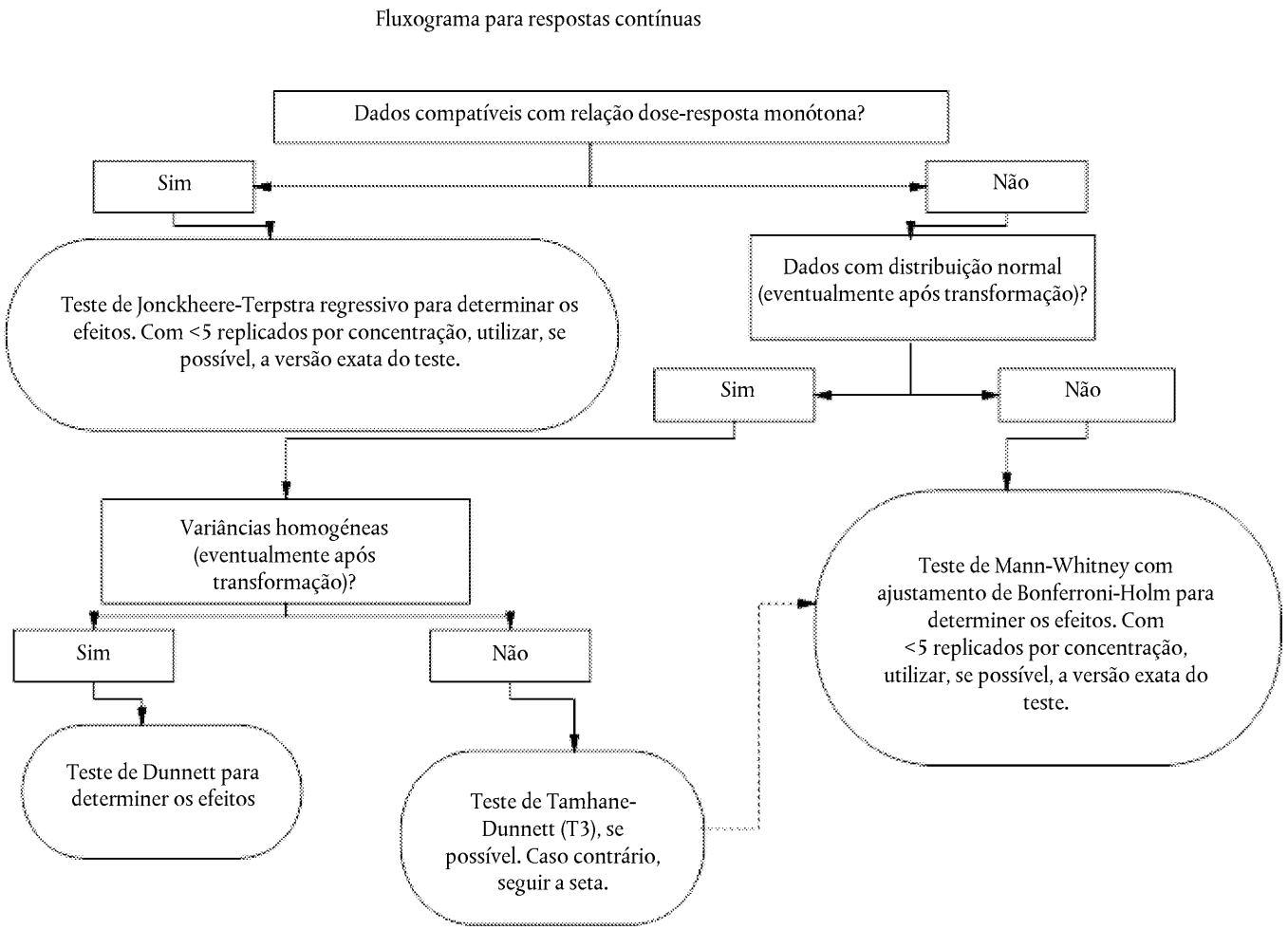
67. A unidade de análise adequada é o replicado. Por conseguinte, aplicam-se o teste de Jonckheere-Terpstra e o teste U de Mann-Whitney às medianas dos replicados e o teste de Dunnett às médias dos replicados. Pode avaliar-se se existe ou não uma relação monótona dose-resposta examinando simplesmente as médias ou medianas dos replicados e dos níveis de exposição ou então realizando os testes formais já referidos (11). Caso o número de replicados por nível de exposição ou por grupo de controlo seja inferior a cinco, deve recorrer-se, se possível, às versões de permutação exata do teste de Jonckheere-Terpstra e do teste de Mann-Whitney. Em todos os testes referidos, o nível de significância a considerar para ajuizar da significância estatística é 0,05.

68. O fluxograma da figura 4 serve para determinar que testes estatísticos aplicar a dados contínuos.

▼M6

Figura 4.

Fluxograma para determinar que método estatístico aplicar a dados de resposta contínuos.



02008R0440 — PT — 16.10.2019 — 008.001 — 2222

▼M6

Considerações especiais relativas à análise dos dados

Níveis de exposição que ficam comprometidos

69. Há vários fatores a ponderar para determinar se um replicado ou todo um nível de exposição gera toxicidade manifesta e deve ser excluído da análise. Considera-se que existe toxicidade manifesta num replicado se a mortalidade unicamente explicável por toxicidade — e não por erro técnico — nele for superior a 2 indivíduos. As hemorragias, comportamentos anómalos, natação anómala, anorexia e quaisquer outros sinais clínicos de doença são indícios adicionais de toxicidade manifesta. No tocante a sinais de toxicidade subletais, pode ser necessário efetuar uma avaliação qualitativa, comparativamente ao grupo de controlo da água limpa.

Grupo de controlo do solvente

70. A utilização de um solvente deve ser sempre considerada uma solução de último recurso, quando todas as outras possibilidades de distribuição do produto químico já tiverem sido ponderadas. Caso se utilize um solvente, é necessário incluir no ensaio um grupo de controlo da água limpa. No termo de ensaio, avaliam-se os efeitos potenciais do solvente. Para isso, efetua-se uma comparação estatística do grupo de controlo do solvente com o grupo de controlo da água limpa. Uma vez que podem ser afetados por toxicidades não associadas à tiroide, os parâmetros mais importantes a ter em conta neste âmbito são o estádio de desenvolvimento, a distância entre a boca e a cloaca e o peso húmido. Caso se detetem diferenças com significância estatística nestes parâmetros, por comparação entre o grupo de controlo da água limpa e o grupo de controlo do solvente, determinam-se os valores dos parâmetros de resposta medidos no estudo utilizando o grupo de controlo da água limpa. Caso não se detetem diferenças com significância estatística entre o grupo de controlo da água limpa e o grupo de controlo do solvente em nenhuma das variáveis de resposta medidas, determinam-se os valores dos parâmetros de resposta medidos no estudo utilizando os grupos de controlo da água de diluição e do solvente reunidos.

Grupos expostos que atingem um estádio de desenvolvimento igual ou superior a 60

71. Após o estádio 60, o tamanho e o peso dos girinos diminuem, devido à reabsorção de tecidos e à redução da massa de água total que contêm. Por conseguinte, não é adequado utilizar medições de peso húmido e de distância entre a boca e a cloaca na análise estatística de diferenças de taxas de crescimento. O peso húmido e os dados dimensionais dos organismos cujo estádio de desenvolvimento segundo Nieuwkoop e Faber seja maior que 60 devem, portanto, ser excluídos e deixam de poder ser utilizados na análise de médias ou medianas de replicados. Nesse caso, há duas maneiras de analisar estes parâmetros relacionados com o crescimento.

72. Uma delas consiste em considerar nas análises estatísticas do peso húmido e/ou da distância entre a boca e a cloaca apenas os girinos cujo estádio de desenvolvimento não exceda 60. Considera-se que esta abordagem permite gerar informações suficientemente robustas acerca da intensidade dos eventuais efeitos no crescimento, desde que seja pequena (≤ 20 %) a proporção de animais sujeitos ao ensaio que são excluídos das análises. Se o número de girinos num estádio de desenvolvimento superior a 60 for maior do que 20 % para uma ou mais concentrações nominais, é necessário efetuar uma análise de variância bifatorial hierarquizada que abranja todos os girinos para avaliar os efeitos da exposição ao produto químico no crescimento, tendo neste caso em conta o efeito dos estádios de desenvolvimento avançados no crescimento. O apêndice 3 contém orientações relativas à análise de variância bifatorial do peso e do comprimento.

REFERÊNCIAS

1) OCDE (2004). Report of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay for the detection of thyroid active substances: Phase 1 — Optimisation of the Test Protocol. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, No. 77. Paris.

▼**M6**

2) OCDE (2007). Final Report of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay: Phase 2 — Multi-chemical Interlaboratory Study. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, No. 76. Paris.

3) OCDE (2008). Report of the Validation Peer Review for the Amphibian Metamorphosis Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, No. 92. Paris.

4) OCDE (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, No. 23. Paris.

5) ASTM (2002). Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. American Society for Testing and Materials. ASTM E729-96(2002). Philadelphia, PA.

6) ASTM (2004). Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay — *Xenopus* (FETAX). E 1439-98.

7) Kahl, M.D., Russom, C.L., DeFoe, D.L., Hammermeister, D.E. (1999). Saturation units for use in aquatic bioassays. *Chemosphere*, 39, pp. 539--551.

8) Nieuwkoop, P.D., Faber, J. (1994). Normal Table of *Xenopus laevis*. Garland Publishing. New York.

9) OCDE (2007). Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, No. 82. Paris.

10) Dodd, M.H.I., Dodd, J.M. (1976). Physiology of Amphibia. Lofts, B. (ed.). Academic Press, New York, pp. 467-599.

11) OCDE (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, No. 54. Paris.

12) Hutchinson, T.H., Shillabeer, N., Winter, M.J., Pickford, D.B. (2006). Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. Review. *Aquatic Toxicology*, 76; pp. 69–92.

▼M6

Apêndice 1

Quadro 1

Condições experimentais do Ensaio de Metamorfose em Anfíbios a 21 dias

Animais sujeitos ao ensaio		Larvas de *Xenopus laevis*	
Estado larvar inicial		Estádio 51 segundo Nieuwkoop e Faber	
Período de exposição		21 dias	
Critérios de seleção das larvas		Estádio de desenvolvimento e comprimento total (facultativo)	
Concentrações ensaiadas		Pelo menos 3 concentrações, abrangendo aproximadamente uma ordem de grandeza	
Regime de exposição		Fluxo contínuo (preferido) e/ou estático com renovação	
Caudal no sistema de ensaio		25 ml/minuto (renovação completa do volume aproximadamente cada 2,7 horas)	
Parâmetros principais / Dias das determinações		Mortalidade	Diariamente
		Estádio de desenvolvimento	Dias 7 e 21
		Comprimento das patas traseiras	Dias 7 e 21
		Distância entre a boca e a cloaca	Dias 7 e 21
		Peso corporal húmido	Dias 7 e 21
		Histologia da tiroide	Dia 21
Água de diluição / Controlo do laboratório		Água da torneira desclorada (filtrada por carvão vegetal) ou fonte laboratorial equivalente	
Densidade de larvas		20 larvas por cuba de ensaio (5 por litro)	
Solução de ensaio por cuba de ensaio		4-10 l (altura mínima de água de 10-15 cm) por cuba de ensaio de vidro ou de aço inoxidável (por exemplo 22,5 cm x 14 cm x 16,5 cm)	
Replicados		4 cubas de replicação de cada concentração ensaiada e 4 replicados de controlo	
Taxa de mortalidade aceitável nas cubas de controlo		≤ 10 % em cada cuba de replicação	
Fixação da tiroide	Número fixado	Todos os girinos (avaliam-se inicialmente 5 girinos por replicado)	
	Zona	Cabeça ou todo o corpo	
	Fluido de fixação	Fixador de Davidson	
Alimentação	Alimento	Micron® da SERA ou equivalente	
	Quantidade / Frequência	Ver no quadro 1 o regime alimentar para o produto Micron® da SERA	
Iluminação	Fotoperíodo	12 horas de luz seguidas de 12 horas de escuridão	

▼**M6**

	Intensidade	600 a 2 000 lux (medidos à superfície da água)
Temperatura da água		22 °C ± 1 °C
pH		6,5 a 8,5
Concentração de oxigénio dissolvido		>3,5 mg/l (>40 % da saturação com ar)
Colheita de amostras para as análises químicas		Uma vez por semana (4 colheitas de amostras por ensaio)

▼M6

Apêndice 2

Quadros para apresentação de dados brutos e de dados de síntese

Quadro 1

Informações gerais sobre o produto químico em estudo.

Informações sobre o produto químico			
	Indicar o produto químico em estudo, as unidades de concentração e as concentrações de exposição		
	Produto químico em estudo:		
	Unidades de concentração:		
	Exposição 1		
	Exposição 2		
	Exposição 3		
	Exposição 4		
	Data (dia 0):		Indicar a data (mm/dd/aa)
	Data (dia 7):		Indicar a data (mm/dd/aa)
	Data (dia 21):		Indicar a data (mm/dd/aa)

Quadro 2

Folha de registo de dados brutos para os dias 7 e 21.

DIA X
DATA 00/00/00

	Concentração	Número da exposição	Número do replicado	Número do indivíduo	Identificador do indivíduo	Estádio de desenvolvimento	Distância entre a boca e a cloaca (mm)	Comprimento das patas traseiras (mm)	Peso húmido do organismo completo (mg)
ROW	TRT	TRT#	REP	IND	ID#	STAGE	BL	HLL	WEIGHT
1	0,00	1							
2	0,00	1							
3	0,00	1							
4	0,00	1							
5	0,00	1							
6	0,00	1							
7	0,00	1							
8	0,00	1							

▼**M6**

	Concentração	Número da exposição	Número do replicado	Número do indivíduo	Identificador do indivíduo	Estádio de desenvolvimento	Distância entre a boca e a cloaca (mm)	Comprimento das patas traseiras (mm)	Peso húmido do organismo completo (mg)
ROW	TRT	TRT#	REP	IND	ID#	STAGE	BL	HLL	WEIGHT
9	0,00	1							
10	0,00	1							
11	0,00	1							
12	0,00	1							
13	0,00	1							
14	0,00	1							
15	0,00	1							
16	0,00	1							
17	0,00	1							
18	0,00	1							
19	0,00	1							
20	0,00	1							
21	0,00	2							
22	0,00	2							
23	0,00	2							
24	0,00	2							
25	0,00	2							
26	0,00	2							
27	0,00	2							
28	0,00	2							
29	0,00	2							
30	0,00	2							
31	0,00	2							
32	0,00	2							
33	0,00	2							

▼**M6**

	Concentração	Número da exposição	Número do replicado	Número do indivíduo	Identificador do indivíduo	Estádio de desenvolvimento	Distância entre a boca e a cloaca (mm)	Comprimento das patas traseiras (mm)	Peso húmido do organismo completo (mg)
ROW	TRT	TRT#	REP	IND	ID#	STAGE	BL	HLL	WEIGHT
34	0,00	2							
35	0,00	2							
36	0,00	2							
37	0,00	2							
38	0,00	2							
39	0,00	2							
40	0,00	2							
41	0,00	3							
42	0,00	3							
43	0,00	3							
44	0,00	3							
45	0,00	3							
46	0,00	3							
47	0,00	3							
48	0,00	3							
49	0,00	3							
50	0,00	3							
51	0,00	3							
52	0,00	3							
53	0,00	3							
54	0,00	3							
55	0,00	3							
56	0,00	3							
57	0,00	3							
58	0,00	3							

▼**M6**

	Concentração	Número da exposição	Número do replicado	Número do indivíduo	Identificador do indivíduo	Estádio de desenvolvimento	Distância entre a boca e a cloaca (mm)	Comprimento das patas traseiras (mm)	Peso húmido do organismo completo (mg)
ROW	TRT	TRT#	REP	IND	ID#	STAGE	BL	HLL	WEIGHT
59	0,00	3							
60	0,00	3							
61	0,00	4							
62	0,00	4							
63	0,00	4							
64	0,00	4							
65	0,00	4							
66	0,00	4							
67	0,00	4							
68	0,00	4							
69	0,00	4							
70	0,00	4							
71	0,00	4							
72	0,00	4							
73	0,00	4							
74	0,00	4							
75	0,00	4							
76	0,00	4							
77	0,00	4							
78	0,00	4							
79	0,00	4							
80	0,00	4							

▼**M6**

Quadro 3

Resumo dos valores calculados para os diversos parâmetros relativos aos dias 7 e 21.

		Estádio de desenvolvimento			Distância entre a boca e a cloaca (mm)		Comprimento das patas traseiras (mm)		Peso (mg)	
Nível de exposição	Replicado	Mínimo	Mediana	Máximo	Média	Desvio-padrão	Média	Desvio-padrão	Média	Desvio-padrão
1	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
1	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
1	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
1	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!

Nota: Efetuam-se os cálculos por casa com base nos dados constantes do quadro 2.

Quadro 4

Mortalidade diária.

Dia do ensaio	Data	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
0	00/00/00																
1	#Value!																
2	#Value!																
3	#Value!																
4	#Value!																
5	#Value!																

▼**M6**

Dia do ensaio	Data	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
6	#Value!																
7	#Value!																
8	#Value!																
9	#Value!																
10	#Value!																
11	#Value!																
12	#Value!																
13	#Value!																
14	#Value!																
15	#Value!																
16	#Value!																
17	#Value!																
18	#Value!																
19	#Value!																
20	#Value!																
21	#Value!																
Soma por replicado		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Soma por nível de exposição		0				0				0				0			

Nota: Efetuam-se os cálculos por casa com base nos dados constantes do quadro 1.

Quadro 5

Critérios de qualidade da água.

Sistema de exposição (fluxo contínuo/estático com renovação):
Temperatura:
Intensidade luminosa:
Ciclo luz-escuridão:
Alimentos:
Quantidade e frequência da alimentação:
pH da água:
Concentração de iodo na água utilizada no ensaio:

▼**M6**

Quadro 6

Síntese dos dados químicos.

Denominação do produto químico:																					
Número CAS:																					
Dia do ensaio	Data	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
0	00/00/00																				
1	#Value!																				
2	#Value!																				
3	#Value!																				
4	#Value!																				
5	#Value!																				
6	#Value!																				
7	#Value!																				
8	#Value!																				
9	#Value!																				
10	#Value!																				
11	#Value!																				
12	#Value!																				
13	#Value!																				
14	#Value!																				
15	#Value!																				
16	#Value!																				
17	#Value!																				
18	#Value!																				
19	#Value!																				
20	#Value!																				
21	#Value!																				

Nota: Efetuam-se os cálculos por casa com base nos dados constantes do quadro 1.

▼**M6**

Quadro 7

Quadros de resultados para os critérios histopatológicos fundamentais.

Data: Produto químico: Patologista:

Identificação do animal de controlo — replicado 1	Identificação do animal de controlo — replicado 2	Hipertrofia da tiroide	Atrofia da tiroide	Hipertrofia das células foliculares da tiroide	Hiperplasia das células foliculares da tiroide
Total:					

Identificação do animal exposto à dose — replicado 1	Identificação do animal exposto à dose — replicado 2	Hipertrofia da tiroide	Atrofia da tiroide	Hipertrofia das células foliculares da tiroide	Hiperplasia das células foliculares da tiroide
Total:					

Identificação do animal exposto à dose — replicado 1	Identificação do animal exposto à dose — replicado 2	Hipertrofia da tiroide	Atrofia da tiroide	Hipertrofia das células foliculares da tiroide	Hiperplasia das células foliculares da tiroide
Total:					

Identificação do animal exposto à dose — replicado 1	Identificação do animal exposto à dose — replicado 2	Hipertrofia da tiroide	Atrofia da tiroide	Hipertrofia das células foliculares da tiroide	Hiperplasia das células foliculares da tiroide
Total:					

▼**M6**

Quadro 8

Outros critérios histopatológicos.

Data: Produto químico: Patologista:

Identificação do animal exposto à dose — replicado 1		Aumento da superfície do lúmen folicular	Diminuição da superfície do lúmen folicular
Identificação do animal exposto à dose — replicado 2			
Total:			

Identificação do animal exposto à dose — replicado 1		Aumento da superfície do lúmen folicular	Diminuição da superfície do lúmen folicular
Identificação do animal exposto à dose — replicado 2			
Total:			

Identificação do animal exposto à dose — replicado 1		Aumento da superfície do lúmen folicular	Diminuição da superfície do lúmen folicular
Identificação do animal exposto à dose — replicado 2			
Total:			

Identificação do animal exposto à dose — replicado 1		Aumento da superfície do lúmen folicular	Diminuição da superfície do lúmen folicular
Identificação do animal exposto à dose — replicado 2			
Total:			

▼**M6**

Quadro 9

Descrição das observações histopatológicas.

Data:

Produto químico:

Patologista:

		Descrição
Identificação do animal de controlo — replicado 1		
Identificação do animal de controlo — replicado 2		
Identificação do animal exposto à dose — replicado 1		
Identificação do animal exposto à dose — replicado 2		

▼**M6**

Identificação do animal exposto à dose — replicado 1		
Identificação do animal exposto à dose — replicado 2		

Identificação do animal exposto à dose — replicado 1		
Identificação do animal exposto à dose — replicado 2		

▼M6

Quadro 10

Quadro-resumo para o dia × (7 ou 21) do Ensaio de Metamorfose em Anfíbios.

		Grupo de controlo				Nível de exposição 1					Nível de exposição 2					Nível de exposição 3				
Parâmetro	Replicado	Média	Desvio-padrão	CV	N	Média	Desvio-padrão	CV	N	Valor p	Média	Desvio-padrão	CV	N	Valor p	Média	Desvio-padrão	CV	N	Valor p
Comprimento das patas traseiras (mm)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Média:																			
Distância entre a boca e a cloaca (mm)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Média:																			
Peso húmido (mg)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Média:																			

02008R0440 — PT — 16.10.2019 — 008.001 — 2238

▼M6

Quadro 11

Quadro-resumo dos dados do estádio de desenvolvimento no dia × (7 ou 21) do Ensaio de Metamorfose em Anfíbios.

		Grupo de controlo				Nível de exposição 1					Nível de exposição 2					Nível de exposição 3				
	Replicado	Mediana	Mín.	Máx.	N	Mediana	Mín.	Máx.	N	Valor p	Mediana	Mín.	Máx.	N	Valor p	Mediana	Mín.	Máx.	Mediana	Valor p
Estádio de desenvolvimento	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Média:																			

▼M6

Apêndice 3

Análise alternativa do peso e do comprimento quando mais de 20 % dos girinos se encontram num estádio de desenvolvimento avançado no caso de uma ou mais concentrações

Se o número de girinos num estádio de desenvolvimento superior a 60 for maior do que 20 % para uma ou mais concentrações nominais, é necessário efetuar uma análise de variância bifatorial hierarquizada que abranja todos os girinos para avaliar os efeitos da exposição ao produto químico no crescimento, tendo neste caso em conta o efeito dos estádios de desenvolvimento avançados no crescimento.

Trata-se de utilizar todos os dados, tendo em conta o efeito dos estádios de desenvolvimento avançados. Para isso, pode recorrer-se a uma análise de variância bifatorial hierarquizada. Define-se o critério Estádio avançado = «Sim» para os animais cujo estádio de desenvolvimento seja igual ou superior a 61. Caso contrário, define-se Estádio avançado = «Não». Em seguida, realiza-se uma análise de variância bifatorial da concentração e do estádio avançado e da interação destes, utilizando Rep(Conc) como fator aleatório e girino(Rep) como outro efeito aleatório. Esta metodologia continua a tratar o replicado como unidade de análise e gera essencialmente os mesmos resultados que uma análise das médias replicado*estádio avançado ponderada pelo número de animais considerados na média. Se os dados não satisfizerem os requisitos da análise de variância no tocante a normalidade ou a homogeneidade da variância, pode resolver-se o problema por meio de uma transformada de ordenamento normalizada.

Além do teste F de análise de variância clássico dos efeitos da concentração, do estádio avançado e das interações destes, pode cindir-se o teste F das interações em dois testes F de análise de variância suplementares, o primeiro aplicado às respostas médias correspondentes às diversas concentrações para Estádio Avançado = «Não» e o segundo aplicado às respostas médias correspondentes às diversas concentrações para Estádio Avançado = «Sim». Realizam-se para cada nível de Estádio Avançado comparações suplementares das médias correspondentes às diversas concentrações de exposição e ao grupo de controlo. Caso se evidencie uma relação dose-resposta não-monótona em algum dos níveis da variável Estádio Avançado, pode efetuar-se uma análise de tendência utilizando os contrastes adequados ou comparações par a par simples. Procede-se a um ajustamento de Bonferroni-Holm dos valores p apenas se a parte correspondente do teste F resultante da referida cisão não tiver significância. Estas operações podem ser realizadas por SAS e, presumivelmente, por outros *softwares* estatísticos. A situação pode complicar-se se, para algumas concentrações, nenhum animal estiver num estádio avançado. Porém, esses casos podem resolver-se sem dificuldade.

▼**M6**

Apêndice 4

Definições

Produto químico: Substância ou mistura.

Produto químico em estudo: Qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado este método de ensaio.

▼M6

C.39. ENSAIO DE REPRODUÇÃO DE COLÊMBOLOS NO SOLO

INTRODUÇÃO

1. Este método é equivalente ao *Test Guideline* TG 232 (2009) da OCDE. Destina-se a avaliar os efeitos de produtos químicos na reprodução de colêmbolos no solo. Baseia-se em procedimentos estabelecidos (1)(2). A *Folsomia candida*, que se reproduz por partenogénese, e a *Folsomia fimetaria*, que se reproduz por via sexual, são duas das espécies mais acessíveis de colêmbulos, pois é possível criá-las e estão disponíveis no comércio. Quando é necessário avaliar habitats não abrangidos por nenhuma destas espécies, o método é extensível a outras espécies de colêmbolos que cumpram os critérios de validade do ensaio.

2. Os colêmbolos, que vivem no solo, são espécies com interesse ecológico para ensaios de ecotoxicidade. Trata-se de hexápodes com um exosqueleto fino muito permeável ao ar e à água e constituem espécies de artrópodes caracterizadas por uma via e uma taxa de exposição distintas das correspondentes às minhocas e aos vermes da família Enchytraeidae.

3. Em muitos ecossistemas terrestres, a densidade populacional de colêmbulos é habitualmente da ordem de 10^5 m^{-2} no solo e na manta morta (3)(4). Os adultos medem normalmente 0,5 a 5 mm e é baixa a contribuição destes animais para a respiração e a biomassa animal totais do solo, apontando as estimativas para valores entre 1 % e 5 % (5). O papel mais importante que desempenham poderá, portanto, ser o de reguladores potenciais de determinados processos através da predação de microrganismos e da microfauna. Uma grandes variedade de invertebrados endogeicos e epigeicos, como os ácaros, as centopeias, as aranhas, os carabídeos e os estafilinídeos, são predadores dos colêmbolos. Os colêmbolos participam nos processos de decomposição nos solos ácidos, nos quais, juntamente com os enquitraídeos, podem ser os invertebrados mais importantes do solo, dada a ausência habitual das minhocas e dos diplópodes nesses casos.

4. A *Folsomia fimetaria* tem uma distribuição planetária e é comum em muitos tipos de solo, desde os solos arenosos aos francos e dos solos húmicos doces (*mull*) aos ácidos (*mor*). Trata-se de um colêmbolo sem olhos e sem pigmentação que se encontra em solos agrícolas de toda a Europa (6). É um animal omnívoro, de cuja alimentação fazem parte hifas fúngicas, bactérias, protozoários e detritos. Por via da pastagem dos animais, interage com infeções imputáveis a fungos fitopatogénicos (7) e pode influenciar micorrizas, como se sabe ser o caso da *Folsomia candida*. Tal como sucede com a maior parte dos colêmbulos, esta espécie reproduz-se por via sexual, sendo necessária a presença permanente de machos para fertilização dos ovos.

5. A *Folsomia candida* tem igualmente uma distribuição planetária. Embora não seja comum na maior parte dos solos naturais, ocorre frequentemente em grande número em locais ricos em húmus. Trata-se também de um colêmbolo sem olhos e sem pigmentação. Dispõem de uma furca (órgão de salto) bem desenvolvida, correm com desenvoltura e saltam facilmente se forem perturbados. Embora viva em solos mais ricos em matéria orgânica, o papel ecológico da *Folsomia candida* é semelhante ao da *Folsomia fimetaria*. Reproduz-se por partenogénese e a ocorrência de machos pode ser inferior a 1 em mil indivíduos.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

6. Expõem-se colêmbolos adultos (*Folsomia fimetaria*) ou juvenis (*Folsomia candida*) a uma gama de concentrações do produto químico em estudo incorporado num solo artificial modificado (8), com teor de matéria orgânica de 5 % (ou num solo alternativo). Pode estabelecer-se uma subdivisão em duas etapas:

   — Um ensaio exploratório da gama de concentrações a utilizar, caso não se disponha de informações de toxicidade suficientes, no qual os principais

▼M6

parâmetros avaliados são a mortalidade e a reprodução — após duas semanas na *Folsomia fimetaria* e após três semanas na *Folsomia candida.*

— Um ensaio de reprodução definitivo, no qual se avaliam o número de juvenis gerados pelos progenitores e a sobrevivência destes últimos. Este ensaio prolonga-se por três semanas no caso da *Folsomia fimetaria* e por quatro semanas no caso da *Folsomia candida*.

Exprime-se o efeito tóxico do produto químico em estudo ao nível da mortalidade e da reprodução dos adultos pelos valores CL_x e CE_x, efetuando, por regressão não-linear, um ajustamento dos dados obtidos a um modelo adequado, a fim de estimar a concentração que causaria x % de mortalidade ou de redução da reprodução ou, em alternativa, o valor NOEC ou LOEC (9).

INFORMAÇÕES SOBRE O PRODUTO QUÍMICO EM ESTUDO

7. É preferível conhecer previamente as propriedades físicas, a hidrossolubilidade, o log K_{ow}, o coeficiente de partição entre a água e o solo e a pressão de vapor do produto químico em estudo. É ainda desejável ter conhecimento do devir no solo do produto químico em estudo, nomeadamente as taxas de fotólise, hidrólise e biodegradação. Caso se disponha dessas informações, devem ser também indicados a identificação do produto químico segundo a nomenclatura da IUPAC, o número CAS, o lote de fabrico, o lote de acondicionamento, a fórmula estrutural e o grau de pureza.

8. Este método de ensaio serve para produtos químicos hidrossolúveis ou insolúveis em água, embora o modo como se aplica ao produto químico em causa varie concomitantemente. O método não é aplicável a produtos químicos voláteis, isto é, a produtos químicos cuja constante de Henry ou cujo coeficiente de partição ar/água seja superior a um, nem a produtos químicos cuja pressão de vapor a 25 °C exceda 0,0133 Pa.

VALIDADE DO ENSAIO

9. Para que os resultados do ensaio sejam considerados válidos, os grupos de controlo, não expostos, devem satisfazer os seguintes critérios:

— Mortalidade média dos adultos no final do ensaio inferior a 20 %;

— Número médio de juvenis por recipiente no final do ensaio não inferior a 100;

— Coeficiente de variação, calculado para o número de juvenis no final do ensaio definitivo, inferior a 30 %.

PRODUTO QUÍMICO DE REFERÊNCIA

10. A fim de verificar se os organismos ensaiados no sistema de ensaio estão a responder dentro dos níveis normais, ensaia-se periodicamente, ou inclui-se em todos os ensaios, um produto químico de referência à concentração CE_{50} para o tipo de solo escolhido para o ensaio. Um produto químico de referência adequado é o ácido bórico, que, a cerca de 100 mg/kg de resíduo seco de solo, deve reduzir a reprodução de ambas as espécies em 50 % (10)(11).

DESCRIÇÃO DO ENSAIO

Recipientes e equipamento

11. São recipientes adequados para o ensaio os que puderem conter 30 g de solo húmido. Podem ser de vidro ou de plástico inerte (não-tóxico). Todavia, não devem ser utilizados recipientes de plástico que, devido a fenómenos de sorção, reduzam a exposição ao produto químico. A superfície do fundo

▼M6

do recipiente deve permitir que a profundidade do solo seja de 2 a 4 cm. Os recipientes devem dispor de tampas (de vidro ou de polietileno, por exemplo) destinadas a reduzir a evaporação de água, mas que não impeçam as permutas gasosas entre o solo e a atmosfera. Para possibilitar a passagem de luz, os recipientes devem ser, pelo menos, translúcidos.

12. É necessário o equipamento normal de laboratório, designadamente o seguinte:

— câmara de secagem;

— microscópio estereoscópico;

— medidor de pH e fotómetro;

— balanças de precisão adequadas;

— equipamento adequado de regulação da temperatura;

— equipamento adequado de regulação da humidade do ar (não essencial se os recipientes de exposição tiverem tampa);

— incubador ou pequena câmara com temperatura controlada;

— pinças ou um dispositivo aspirador de baixa sucção.

Preparação do solo a ensaiar

13. Utiliza-se um solo artificial modificado (8) com teor de matéria orgânica de 5 %. Caso um solo artificial não se assemelhe ao solo natural, pode utilizar-se como alternativa um solo natural. A composição recomendada do solo artificial (pesos secos, após secagem até peso constante a 105 °C) é a seguinte:

— 5 % de turfa *Sphagnum* seca ao ar e finamente moída (granulometria aceitável: 2 ± 1 mm);

— 20 % de argila caulínica (de preferência com teor de caulinite superior a 30 %);

— aproximadamente 74 % de areia industrial seca ao ar (em função da quantidade de $CaCO_3$ necessária), com predominância de areia fina constituída por mais de 50 % de partículas de 50 a 200 micra. A quantidade exata de areia depende da quantidade de $CaCO_3$ (ver a seguir); juntos, devem representar 75 %;

— 1,0 % de carbonato de cálcio ($CaCO_3$ de qualidade analítica pulverizado), a fim de obter um pH de 6,0 ± 0,5; a quantidade de carbonato de cálcio a adicionar depende sobretudo da qualidade/natureza da turfa (ver a nota 1).

Nota 1: A quantidade de $CaCO_3$ necessária depende dos componentes do substrato de solo e determina-se medindo imediatamente antes do ensaio o pH de subamostras de solo húmido pré-incubado.

Nota 2: Tendo em vista a normalização ulterior e uma melhor interpretação dos resultados, recomenda-se a medição do pH e, facultativamente, da razão C/N, da capacidade de permuta catiónica e do teor de matéria orgânica do solo.

Nota 3: Se necessário, por exemplo para determinadas finalidades de ensaio, também podem ser utilizados como substrato de ensaio e/ou de cultura solos naturais não-poluídos. Porém, caso se utilizem solos naturais, estes devem estar isentos de qualquer contaminação e é necessário caracterizá-los, pelo menos, quanto à origem (local de proveniência), ao pH, à textura (distribuição granulométrica), à capacidade de permuta catiónica e ao teor de matéria orgânica. Antes de utilizar um solo natural num ensaio definitivo, é aconselhável demonstrar que o mesmo é adequado para o ensaio e que permite cumprir os critérios de validade do ensaio.

▼M6

14. Misturam-se cuidadosamente os componentes secos do solo (por exemplo num misturador laboratorial grande). Determina-se a capacidade máxima de retenção de água do solo artificial como se descreve no apêndice 5. Otimiza-se o teor de humidade do solo utilizado no ensaio de modo a obter uma estrutura solta porosa que permita aos colêmbolos penetrarem nos poros. Este teor situa-se, normalmente, entre 40 % e 60 % da capacidade máxima de retenção de água.

15. Para equilibrar/estabilizar a acidez do solo, 2 a 7 dias antes do início do ensaio pré-humedece-se o solo artificial seco com a quantidade de água desionizada suficiente para obter aproximadamente metade do teor final de humidade. Para determinar o pH, utiliza-se (como se explica no apêndice 6) uma mistura 1:5 de solo com solução 1 M de cloreto de potássio (KCl) ou com solução 0,01 M de cloreto de cálcio ($CaCl_2$). Se o solo for mais ácido do que o intervalo admitido, pode ajustar-se a acidez adicionando uma quantidade adequada de $CaCO_3$. Se o solo for demasiado alcalino, pode ajustar-se a alcalinidade como um ácido inorgânico inócuo para os colêmbolos.

16. Divide-se o solo pré-humedecido num número de porções correspondente ao número de concentrações e de grupos de controlo a ensaiar (acrescidos do produto químico de referência, se for o caso). Adicionam-se os produtos químicos em estudo e regula-se o teor de água de acordo com o ponto 24.

Seleção e preparação dos animais a utilizar no ensaio

17. Dado que o estudo interlaboratorial comparativo deste método de ensaio (11) revelou que a *Folsomia candida* cumpre os critérios de validade relativos à sobrevivência mais frequentemente do que a *Folsomia fimetaria*, a espécie recomendada é a primeira (reprodução por partenogénese). Caso se utilize outra espécie, terá a mesma de cumprir os critérios de validade indicados no ponto 9. No início do ensaio, os animais devem apresentar-se bem alimentados e ter idade compreendida entre 23 e 26 dias (*Folsomia fimetaria*) ou 9 e 12 dias (*Folsomia candida*). O número de animais por replicado é o seguinte: 10 machos e 10 fêmeas no caso da *Folsomia fimetaria*; 10 fêmeas no caso da *Folsomia candida* (ver o apêndice 2 e o apêndice 3). Para cada replicado, selecionam-se aleatoriamente animais síncronos das placas e verifica-se o estado físico e de saúde em que os mesmos se encontram. Deposita-se cada grupo de 10 ou 20 indivíduos num recipiente de ensaio selecionado aleatoriamente, escolhendo-se fêmeas grandes de *Folsomia fimetaria*, de modo que possam distinguir-se facilmente dos machos da mesma espécie.

Preparação das concentrações a utilizar no ensaio

18. São quatro os métodos de aplicação do produto químico em estudo que podem ser utilizados: 1) incorporação do produto químico no solo utilizando água como veículo; 2) incorporação do produto químico no solo utilizando um solvente orgânico como veículo; 3) incorporação do produto químico no solo utilizando areia como veículo; ou 4) aplicação do produto químico na superfície do solo. A escolha do método mais adequado depende das características do produto químico e da finalidade do ensaio. Em geral, recomenda-se a mistura do produto químico em estudo com o solo. Pode, no entanto, exigir-se um método de aplicação coerente com a utilização prática do produto químico (por exemplo pulverização de formulações líquidas ou utilização de formulações pesticidas especiais, como grânulos ou produtos de tratamento de sementes). A menos que seja aplicado à superfície do solo, aplica-se o produto químico em estudo antes de se transferirem o colêmbolos para o solo e de os deixar penetrar em seguida neste.

Produtos químicos hidrossolúveis

19. Prepara-se uma solução do produto químico em estudo em água desionizada, em quantidade suficiente para todos os replicados de cada concentração a ensaiar. Mistura-se cuidadosamente cada solução do produto químico em estudo com um lote de solo pré-humedecido, após o que se transferem as misturas para os recipientes de ensaio.

Produtos químicos insolúveis em água

20. No caso dos produtos químicos insolúveis em água, mas solúveis em solventes orgânicos, pode dissolver-se o produto químico em estudo no volume mínimo de um solvente adequado (por exemplo acetona) que permita uma

▼M6

boa mistura do produto químico com o solo, misturando-o em seguida com uma parte da areia quartzítica necessária. Apenas podem ser utilizados solventes orgânicos voláteis. Caso se utilize um solvente orgânico, todas as concentrações a ensaiar e o grupo adicional de controlo negativo do solvente devem conter a mesma quantidade mínima de solvente. Para que o solvente utilizado na aplicação do produto químico tóxico em estudo se possa evaporar, deixam-se algum tempo sem tampa os recipientes onde aquele foi aplicado, mas inviabilizando qualquer dissipação do produto químico durante esse período.

Produtos químicos fracamente solúveis em água e em solventes orgânicos

21. No caso dos produtos químicos fracamente solúveis em água e em solventes orgânicos, mistura-se uma parte da areia quartzítica de constituição do solo com a quantidade do produto químico em estudo necessária para obter a concentração pretendida no ensaio. Mistura-se cuidadosamente esta mistura de areia quartzítica e produto químico com o solo previamente humedecido por adição da quantidade de água desionizada adequada para obter o teor de humidade necessário. Distribui-se a mistura final pelos recipientes de ensaio. Repete-se o processo para cada concentração a ensaiar, preparando-se igualmente um grupo de controlo adequado.

Aplicação na superfície do solo do produto químico em estudo

22. Caso o produto químico em estudo seja um pesticida, pode justificar-se aplicá-lo por pulverização na superfície do solo. Nesta eventualidade, procede-se à aplicação do produto químico depois de os colêmbolos serem transferidos para o solo. Começa-se por colocar o substrato de solo humedecido nos recipientes de ensaio, transferem-se os animais para os recipientes e, em seguida, pesam-se estes um a um. Para evitar a exposição direta dos animais ao produto químico por contacto direto daqueles com este, aplica-se o produto químico em estudo pelo menos meia hora antes da transferência dos colêmbolos para o solo. Utilizando um pulverizador de laboratório que permita simular adequadamente a pulverização no terreno, aplica-se, o mais uniformemente possível, o produto químico em estudo na superfície do solo. A aplicação deve decorrer dentro de uma margem de temperatura de ± 2 °C e, no caso das soluções, emulsões ou dispersões aquosas, em observância da taxa de aplicação de água prevista nas recomendações de avaliação de riscos (a verificar por uma técnica de calibração adequada). O método de aplicação de formulações especiais como grânulos ou produtos de tratamento de sementes pode ser coerente com a prática agrícola. Fornece-se o alimento depois da pulverização.

PROCEDIMENTO DE ENSAIO

Condições de realização do ensaio

23. Realiza-se o ensaio à temperatura média de 20 °C ± 1 °C, sendo a gama de temperaturas admitida de 20 °C ± 2 °C. Durante o ensaio sucedem-se ciclos controlados de luz-escuridão (12 horas de luz seguidas de 12 horas de escuridão), devendo a iluminação da zona onde se encontram os recipientes de ensaio situar-se entre 400 lux e 800 lux.

24. Para verificar a humidade do solo, pesam-se os recipientes no início, a meio e no final do ensaio. Caso se detetem perdas de peso superiores a 2 %, adiciona-se água desionizada para as compensar. Note-se que as perdas de água podem ser reduzidas mantendo uma humidade do ar elevada no incubador utilizado no ensaio.

25. Mede-se o pH no início e no final do ensaio exploratório da gama de concentrações e do ensaio definitivo. Efetuam-se as medições numa amostra de controlo suplementar e numa amostra suplementar de solo exposto por cada concentração do produto químico em estudo, preparadas e mantidas do mesmo modo que as culturas ensaiadas, mas sem para elas transferir os colêmbolos.

Procedimento de ensaio e medições

26. A quantidade de solo a transferir para os recipientes de ensaio de cada concentração é de 30 g (peso fresco) por recipiente. Preparam-se igualmente

▼M6

recipientes de controlo da água, sem incorporação do produto químico em estudo. Caso se utilize um veículo para a aplicação do produto químico em estudo, procede-se ao ensaio, paralelamente à série exposta àquele, de uma série de controlo apenas com o veículo. Se forem utilizados solventes ou dispersantes, a sua concentração deve ser igual à utilizada nos recipientes de ensaio que contêm o produto químico em estudo.

27. Transfere-se com cuidado cada colêmbolo para o recipiente de ensaio que lhe foi atribuído aleatoriamente, colocando-se o animal na superfície do solo. Para melhor transferir os colêmbolos, pode recorrer-se a um dispositivo aspirador de ar de baixa sucção. O número de replicados das concentrações ensaiadas e de replicados de controlo depende do tipo de ensaio utilizado. Dispõem-se os recipientes de ensaio aleatoriamente no incubador e modifica-se aleatoriamente a posição de cada recipiente uma vez por semana.

28. Nos ensaios com *Folsomia fimetaria*, utilizam-se em cada recipiente vinte adultos (10 machos e 10 fêmeas) com 23 a 26 dias de idade. Ao 21.º dia, retiram-se os colêmbolos do solo e contam-se. O sexo dos *Folsomia fimetaria* que integram o lote de animais sincronizados utilizado no ensaio distingue-se pelo tamanho. Com efeito, as fêmeas são nitidamente maiores do que os machos (ver o apêndice 3).

29. Nos ensaios com *Folsomia candida* utilizam-se em cada recipiente dez juvenis com 9 a 12 dias. Ao 28.º dia, retiram-se os colêmbolos do solo e contam-se.

30. Como fonte alimentar adequada, adiciona-se no início do ensaio e após cerca de duas semanas a cada recipiente uma quantidade suficiente (por exemplo 2 a 10 mg) de levedura de padeiro desidratada granulada, disponível no comércio para uso doméstico.

31. No final do ensaio, determina-se a mortalidade e a reprodução. Após 3 semanas (*Folsomia fimetaria*) ou 4 semanas (*Folsomia candida*), retiram-se os colêmbolos do solo utilizado no ensaio (ver o apêndice 4) e contam-se (12). Contam-se como mortos os colêmbulos que não sejam retirados. Os métodos de retirada e de contagem carecem de validação. Para que um método de retirada possa ser validado, a extração de juvenis tem de ser superior a 95 %, o que pode ser avaliado adicionando um número conhecido de indivíduos ao solo.

32. No apêndice 2, resumem-se e estabelece-se a cronologia das diversas etapas do procedimento de ensaio.

Planeamento do ensaio

Ensaio exploratório da gama de concentrações

33. Se necessário, realiza-se um ensaio exploratório da gama de concentrações a utilizar ensaiando, por exemplo, dois replicados de cada uma de cinco concentrações do produto químico em estudo (0,1, 1,0, 10, 100 e 1 000 mg/kg de peso seco de solo) e de cada grupo de controlo. Para tomar decisões acerca das concentrações a utilizar neste ensaio exploratório, pode ser útil dispor de informações adicionais acerca da mortalidade e reprodução dos colêmbolos, provenientes de ensaios de produtos químicos semelhantes ou de referências bibliográficas.

34. Para garantir o surgimento de uma geração de juvenis, a duração do ensaio exploratório é de duas semanas no caso da *Folsomia fimetaria* e de três semanas no caso da *Folsomia candida*. No final do ensaio, determina-se a mortalidade e a reprodução dos colêmbolos. Registam-se o número de adultos e o número de juvenis.

Ensaio definitivo

35. Para determinar uma CE_x (por exemplo CE_{10} ou CE_{50}), ensaiam-se doze concentrações. Recomenda-se a utilização de, pelo menos, dois replicados de cada concentração de exposição ensaiada e de seis replicados de controlo. O intervalo entre as diversas concentrações utilizadas varia em função da relação dose-resposta.

▼M6

36. Para determinar a NOEC/LOEC, é necessário ensaiar, pelo menos, cinco concentrações em série geométrica. Recomenda-se a utilização de quatro replicados de cada concentração de exposição ensaiada e de oito replicados de controlo. O intervalo entre concentrações consecutivas deve ser expresso por um fator não superior a 1,8.

37. É possível determinar conjuntamente a NOEC/LOEC e a CE_x, utilizando para o efeito oito concentrações de exposição em série geométrica. Recomenda-se, neste caso, a utilização de quatro replicados de cada concentração de exposição ensaiada e de oito replicados de controlo. O intervalo entre concentrações consecutivas deve ser expresso por um fator não superior a 1,8.

38. Se não for observado nenhum efeito para a concentração mais elevada do ensaio exploratório da gama de concentrações a utilizar (1 000 mg/kg), pode assimilar-se o ensaio da reprodução a um ensaio do limite, utilizando uma concentração de exposição de 1 000 mg/kg e o grupo de controlo. Um ensaio do limite permitirá demonstrar a inexistência de efeitos com significância estatística à concentração limite. Nesse caso, utilizam-se oito replicados do solo exposto e oito replicados de controlo.

DADOS E RELATÓRIOS

Tratamento dos resultados

39. O principal parâmetro é a produção de descendência (número de juvenis produzido por recipiente de ensaio). Efetua-se uma análise estatística, por exemplo uma análise de variância (ANOVA), para estabelecer uma comparação por meio do teste t de Student, do teste de Dunnett ou do teste de Williams entre os níveis de exposição. Calculam-se os intervalos de confiança a 95 % para as médias correspondentes a cada nível de exposição.

40. O número de adultos sobreviventes nos grupos de controlo, não-expostos ao produto químico em estudo, é um critério de validação fundamental de que é necessário guardar registo. Tal como no ensaio exploratório da gama de concentrações a utilizar, também devem ser referidos no relatório final todos os outros indícios de efeitos nocivos.

CL_x e CE_x

41. Calculam-se os valores de CE_x, assim como os correspondentes limites de confiança a 95 % superior e inferior deste parâmetro, recorrendo a métodos estatísticos adequados (função logística ou de Weibull, método simplificado de Spearman-Karber ou interpolação simples). Determina-se a CE_x inserindo na equação obtida o valor correspondente a x % da média do grupo de controlo. Para calcular a CE_{50} ou qualquer outra CE_x, procede-se a uma análise de regressão da série completa de dados. A CL_{50} é normalmente estimada por análise da função probit ou por análises similares que tenham em conta a distribuição binomial dos dados de mortalidade.

NOEC/LOEC

42. Caso se pretenda determinar a NOEC/LOEC por análise estatística, é necessário dispor de dados estatísticos por recipiente (sendo cada recipiente considerado um replicado). Devem ser utilizados métodos estatísticos adequados, de acordo com o documento n.º 54 da OCDE intitulado *Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application* (9). Em geral, investigam-se os efeitos adversos do produto químico em estudo, comparativamente ao grupo de controlo, efetuando testes de hipóteses unilaterais para $p \leq 0,05$.

43. Pode testar-se a normalidade da distribuição e a homogeneidade da variância recorrendo a um teste estatístico adequado, por exemplo o teste de Shapiro-Wilk e o teste de Levene, respetivamente ($p \leq 0,05$). Podem também ser

▼M6

efetuados uma análise de variância unifatorial e os subsequentes testes de múltiplas comparações. Pode recorrer-se a múltiplas comparações (por exemplo o teste de Dunnett) ou a testes de tendência regressivos (por exemplo o teste de Williams) para determinar se há diferenças com significância estatística ($p \leq 0,05$) entre os grupos de controlo e as diversas concentrações do produto químico em estudo — para escolher o teste recomendado, consultar o documento n.º 54 da OCDE (9). Alternativamente, pode recorrer-se a métodos não-paramétricos (por exemplo, o teste U com ajustamento de Bonferroni-Holm ou o teste de tendência de Jonckheere-Terpstra) para determinar a NOEC e a LOEC.

Ensaio do limite

44. Caso se tenha realizado um ensaio do limite (comparação do grupo de controlo unicamente com um nível de exposição) e estejam preenchidos os requisitos para a realização de testes paramétricos (no tocante a normalidade e homogeneidade), pode efetuar-se uma avaliação das respostas mensuráveis recorrendo ao teste t de Student. Se aqueles requisitos não estiverem preenchidos, pode utilizar-se um teste t de variância desigual (teste t de Welch) ou um teste não-paramétrico, como o teste U de Mann-Whitney.

45. Para verificar se existem diferenças com significância entre grupos de controlo (grupo de controlo e grupo de controlo do solvente), pode efetuar-se um teste aos replicados de cada grupo de controlo como se explicou para o ensaio do limite. Caso os testes realizados não detetem diferenças com significância estatística, podem agregar-se todos os replicados do grupo de controlo e do grupo de controlo do solvente. Caso contrário, é necessário comparar cada nível de exposição com o grupo de controlo do solvente.

Relatório do ensaio

46. Elementos mínimos a constar do relatório do ensaio:

Produto químico em estudo

— identidade, lote de fabrico, lote de acondicionamento, número CAS, grau de pureza;

— propriedades físico-químicas (por exemplo log K_{ow}, hidrossolubilidade, pressão de vapor, constante de Henry (H) e, de preferência, informações sobre o devir no solo do produto químico em estudo) conhecidas;

— formulação do produto químico e aditivos, caso não se ensaie o produto químico puro.

Organismos utilizados no ensaio

— identificação da espécie e do fornecedor, descrição das condições de criação e faixa etária.

Condições de realização do ensaio

— descrição do esquema e do protocolo experimental;

— pormenores da preparação do solo ensaiado; caso se utilize um solo natural, especificações pormenorizadas do mesmo (origem, história, distribuição granulométrica, pH, teor de matéria orgânica);

— capacidade de retenção de água do solo;

— descrição da técnica utilizada para aplicar ao solo o produto químico em estudo;

— condições de realização do ensaio: intensidade luminosa, duração dos ciclos luz-escuridão, temperatura;

— descrição do regime alimentar, tipo e quantidade do alimento utilizado no ensaio, datas de alimentação;

— pH e teor de humidade do solo no início e no final do ensaio (grupo de controlo e cada nível de concentração);

— descrição pormenorizada do método de retirada dos animais dos recipientes e eficiência desta.

▼M6

Resultados do ensaio

— número de juvenis determinado em cada recipiente de ensaio no final do ensaio;

— número de adultos determinado em cada recipiente de ensaio no final do ensaio e mortalidade correspondente (%);

— descrição dos sintomas fisiológicos ou patológicos manifestos e das alterações comportamentais evidentes;

— resultados obtidos com o produto químico de referência;

— valores NOEC/LOEC, CL_x referente à mortalidade e CE_x referente à reprodução (principalmente CL_{50}, CL_{10}, CE_{50} e CE_{10}) e respetivos intervalos de confiança a 95 %; gráfico do modelo de ajustamento utilizado no cálculo, equação da função correspondente e parâmetros do mesmo — ver (9);

— todas as informações e constatações úteis para a interpretação dos resultados;

— poder do teste realizado, caso se tenham efetuado testes de hipóteses (9);

— desvios dos procedimentos descritos neste método de ensaio e ocorrências inabituais durante o ensaio;

— validade do ensaio;

— relativamente à NOEC, quando estimada, diferença mínima detetável.

REFERÊNCIAS

1) Wiles, J.A., Krogh, P.H. (1998). Testing with the collembolans *I. viridis*, *F. candida* and *F. fimetaria*. *In* Handbook of soil invertebrate toxicity tests (Løkke, H., Van Gestel, C.A.M., editores), pp. 131-156. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester.

2) ISO (1999). Soil Quality — Effects of soil pollutants on Collembola (*Folsomia candida*): Method for determination of effects on reproduction. n.º 11267. Organização Internacional de Normalização, Genebra.

3) Burges, A., Raw, F. (editores) (1967). Soil Biology. Academic Press. Londres.

4) Petersen, H., Luxton, M. (1982). A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. *Oikos*, 39:287-388.

5) Petersen, H. (1994). A review of collembolan ecology in ecosystem context. *Acta Zoologica Fennica*, 195:111-118.

6) Hopkin, S.P. (1997). *Biology of the Springtails (Insecta: Collembola)*. Oxford University Press. 330 pp. (ISBN 0-19-854084-1).

7) Ulber, B. (1983). Einfluss von *Onychirurus fimatus* Gisin (Collembola, Onychiuridae) und *Folsomia fimetaria* L. (Collembola, Isotomidae) auf *Pythium ultimum* Trow. einen Erreger des Wurzelbrandes der Zuckerrübe. *In* New trends in soil Biology (Lebrun, Ph., André, H.M., De Medts, A., Grégoire-Wibo, C., Wauthy, G. (editores), Proceedings of the VI. international colloquium on soil zoology. Louvain-la-neuve (Bélgica), 30 de agosto a 2 de setembro de 1982. I Dieu-Brichart, Ottignies-Louvain-la-Neuve, pp. 261-268.

8) Capítulo C.36 deste anexo: Ensaio de reprodução no solo do ácaro predador *Hypoaspis* (*Geolaelaps*) *aculeifer*.

9) OCDE (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. OECD series on testing and assessment, No. 54. ENV/JM/MONO(2006)18. OCDE, Paris.

10) Scott-Fordsmand, J.J., Krogh, P.H. (2005). Background report on prevalidation of an OECD springtail test guideline. Environmental Project No. 986. Miljøstyrelsen, Agência de Proteção do Ambiente, Ministério do Ambiente da Dinamarca, 61 pp.

▼**M6**

11) Krogh, P.H. (2009). Toxicity testing with the collembolans *Folsomia fimetaria* and *Folsomia candida* and the results of a ringtest. Environmental Project n.º 1256, 66 pp. Agência de Proteção do Ambiente da Dinamarca.

12) Krogh, P.H., Johansen, K., Holmstrup, M. (1998). Automatic counting of collembolans for laboratory experiments. *Appl. Soil Ecol.*, 7, 201-205.

13) Fjellberg, A. (1980). Identification keys to Norwegian collembolans. Norsk Entomologisk Forening.

14) Edwards, C.A. (1955). Simple techniques for rearing *Collembola*, *Symphyla* and other small soil inhabiting arthropods. *In* Soil Zoology (Kevan, D.K. McE., editor), pp. 412-416. Butterworths. Londres.

15) Goto, H.E. (1960). Simple techniques for the rearing of *Collembola* and a not on the use of a fungistatic substance in the cultures. *Entomologists' Monthly Magazine*, 96:138-140.

▼M6

Apêndice 1

Definições

Aplicam-se neste método as seguintes definições (neste ensaio, as concentrações definidas com base nos efeitos que lhes estão associados exprimem-se em termos de massa do produto químico em estudo por massa de resíduo seco do solo ensaiado):

Produto químico: substância ou mistura.

NOEC (concentração sem efeitos observáveis): concentração do produto químico em estudo à qual não se observa nenhum efeito do mesmo. Neste ensaio, a concentração NOEC não tem nenhum efeito com significância estatística ($p < 0,05$) num determinado período de exposição, comparativamente ao grupo de controlo.

LOEC (menor concentração com efeitos observáveis): menor concentração do produto químico em estudo que tem algum efeito com significância estatística ($p < 0,05$) num determinado período de exposição, comparativamente ao grupo de controlo.

CE_x (concentração com x % de efeitos): concentração que causa efeitos em x % dos organismos sujeitos a ensaio num determinado período de exposição, comparativamente ao grupo de controlo. Por exemplo, a CE_{50} é uma concentração que causa efeitos, num parâmetro ensaiado, em 50 % da população exposta durante o período definido.

Produto químico em estudo: qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado este método de ensaio.

▼M6

Apêndice 2

Principais etapas do ensaio com colêmbolos e cronologia das mesmas

As etapas do ensaio podem ser resumidas da seguinte forma:

Cronologia (dia)	Ação
-23 a -26	Preparação de uma cultura síncrona de *Folsomia fimetaria.*
-14	Preparação do solo artificial (mistura dos componentes secos). Verificação do pH do solo artificial e ajustamento eventualmente necessário. Medição da capacidade máxima de retenção de água do solo.
-9 a -12	Preparação de uma cultura síncrona de *Folsomia candida.*
-2 a -7	Pré-humedecimento do solo.
–1	Repartição dos juvenis por lotes. Preparação das soluções de reserva e aplicação do produto químico em estudo, caso a aplicação seja por meio de um solvente orgânico.
0	Preparação das soluções de reserva e aplicação do produto químico em estudo, caso se trate da aplicação de um produto químico sólido ou hidrossolúvel ou se o mesmo for aplicado à superfície do solo. Medição do pH do solo e pesagem de cada recipiente. Fornecimento de alimento. Introdução dos colêmbolos.
14	Ensaio exploratório da gama de concentrações a utilizar no caso da *Folsomia fimetaria:* termo do ensaio, retirada dos animais, medição do pH do solo e da perda de água (peso) do solo. Ensaios definitivos: medição do teor de humidade, reposição de água e adição de 2-10 mg de leveduras.
21	Ensaio definitivo da *Folsomia fimetaria:* termo do ensaio, retirada dos animais, medição do pH do solo e da perda de água (peso) do solo. Ensaio exploratório da gama de concentrações a utilizar no caso da *Folsomia candida:* termo do ensaio, retirada dos animais, medição do pH do solo e da perda de água (peso) do solo.
28	Ensaio definitivo da *Folsomia candida:* termo do ensaio, retirada dos animais, medição do pH do solo e da perda de água (peso) do solo.

▼M6

Apêndice 3

Orientações relativas à criação e sincronização de *Folsomia fimetaria* e de *Folsomia candida*

A cronologia e as durações aqui indicadas devem ser verificadas para cada estirpe de colêmbolos, a fim de garantir que os tempos previstos são suficientes para que se disponha do número necessário de juvenis sincronizados. Basicamente, são a postura de ovos após transferência dos adultos para um substrato fresco e a subsequente eclosão dos mesmos que determinam o dia adequado de recolha de ovos e de juvenis síncronos.

Recomenda-se a existência em permanência de uma cultura de reserva, constituída, por exemplo, por 50 recipientes/placas de Petri. Deve manter-se a cultura de reserva em boas condições de alimentação, fornecendo-lhe semanalmente alimentos e água e dela retirando o alimento velho e as carcaças. Se o número de colêmbolos presentes no substrato for demasiado pequeno, pode haver um acréscimo de desenvolvimento fúngico com consequências em termos de inibição. Caso se utilize muito frequentemente a cultura de reserva na produção de ovos, a cultura pode esgotar-se. Constituem sinais de esgotamento a presença de adultos mortos e de bolores no substrato. Os ovos sobejantes da produção de animais síncronos podem ser utilizados para rejuvenescer a cultura.

Numa cultura síncrona de *Folsomia fimetaria*, distinguem-se os machos das fêmeas em primeiro lugar pelo tamanho. Os machos são claramente mais pequenos do que as fêmeas e deslocam-se mais rapidamente do que estas. Não é necessária grande experiência para determinar corretamente o sexo, podendo este ser confirmado por inspeção da zona genital ao microscópio (13).

1. **Criação**

1.a) *Preparação do substrato de cultura*

O substrato de cultura é constituído por gesso de paris (sulfato de cálcio) com carvão vegetal ativado. Esta mistura proporciona um substrato húmido, sendo a função do carvão vegetal absorver as excreções e os gases gerados (14)(15). Podem ser utilizadas diversas formas de carvão vegetal para facilitar o exame dos colêmbolos. Por exemplo, utiliza-se carvão vegetal em pó para a *Folsomia candida* e a *Folsomia fimetaria* (obtendo-se um gesso de paris negro ou cinzento):

Componentes do substrato:

— 20 ml de carvão vegetal ativado,

— 200 ml de água destilada,

— 200 ml de gesso de paris;

ou

— 50 g de carvão vegetal ativado em pó,

— 260-300 ml de água destilada,

— 400 g de gesso de paris.

Deixa-se a mistura constituinte do substrato repousar antes de a utilizar.

1.b) *Reprodução*

Mantêm-se os colêmbolos em recipientes — por exemplo placas de Petri (90 mm × 13 mm) — com o fundo coberto por uma camada de 0,5 cm de substrato de gesso e de carvão vegetal. Criam-se os animais à temperatura de 20 °C ± 1 °C com ciclos de 12 horas de luz seguidos de 12 horas de escuridão (400-800 lux). Mantêm-se os recipientes sempre húmidos, de modo que a humidade relativa do ar dentro deles seja de 100 %. Para isso, pode haver água livre no interior do gesso (poroso), mas não uma película

▼M6

de água à superfície deste. Podem ser evitadas perdas de água mantendo húmido o ar ambiente. Removem-se dos recipientes todos os indivíduos mortos e o alimento bolorento. Para estimular a produção de ovos, é necessário transferir espécimes adultos para placas de Petri guarnecidas com substrato fresco de gesso de paris e carvão vegetal.

1.c) *Fonte alimentar*

A única fonte alimentar utilizada para a *Folsomia candida* e a *Folsomia fimetaria* é um granulado de levedura de padeiro desidratada. Para evitar a formação de bolores, prepara-se alimento novo uma ou duas vezes por semana. Coloca-se o alimento à superfície do gesso de paris, formando um pequeno montículo. Ajusta-se a quantidade de levedura de padeiro à dimensão da população de colêmbolos; em geral, são suficientes 2-15 mg.

2. **Sincronização**

A fim de obter animais homogéneos, no mesmo estádio de desenvolvimento e com o mesmo tamanho, é necessário realizar o ensaio com animais sincronizados. Além disso, a sincronização permite distinguir os machos das fêmeas de *Folsomia fimetaria* a partir das três semanas de idade, com base no dimorfismo sexual refletido na diferença de tamanhos. Descreve-se a seguir uma maneira de obter animais sincronizados (as etapas práticas são meras sugestões).

2.a) *Sincronização*

— Preparam-se recipientes com uma camada de substrato de gesso de paris e carvão vegetal com 0,5 cm de espessura.

— Para a postura, transferem-se para novos recipientes 150 a 200 adultos de *Folsomia fimetaria* e 50 a 100 adultos de *Folsomia candida* dos melhores 15 a 20 recipientes da cultura de reserva com substrato de 4 a 8 semanas e fornece-se-lhes 15 mg de levedura de padeiro. Não transferir juvenis juntamente com os adultos, pois a presença de juvenis pode inibir a produção de ovos.

— Mantém-se a cultura à temperatura de 20 °C ± 1 °C (média de 20 °C), com ciclos de 12 horas de luz seguidos de 12 horas de escuridão (400--800 lux). É necessário que haja alimento fresco e que o ar esteja saturado de humidade. A falta de alimento pode levar os animais a defecarem nos ovos, com formação de fungos à superfície destes; no caso da *Folsomia candida*, os animais podem comer os próprios ovos. Após 10 dias, recolhem-se cuidadosamente os ovos com uma agulha e uma espátula e transferem-se para pequenos pedaços de papel de filtro previamente embebido numa calda de gesso de paris e carvão vegetal, colocados num recipiente com substrato fresco de gesso e carvão vegetal. Para atrair os juvenis e fazê-los sair do papel de filtro, adicionam-se alguns grânulos de levedura. É importante que o papel de filtro e o substrato estejam húmidos, para que os ovos não se desidratem. Outra possibilidade é remover os adultos das caixas de cultura sincronizada depois de produzirem ovos durante 2 ou 3 dias.

— Após três dias, a maior parte dos ovos à superfície do papel de filtro terão eclodido, podendo encontrar-se alguns juvenis por debaixo desse papel.

— Para que a idade dos juvenis seja homogénea, retira-se com uma pinça da placa de Petri o papel de filtro com os ovos ainda não eclodidos. Deixam-se os juvenis (que têm 0 a 3 dias) na placa de Petri e alimentam-se com levedura de padeiro. Descartam-se os ovos não eclodidos.

— Cultivam-se os ovos e os juvenis do mesmo modo que os adultos. No caso da *Folsomia fimetaria*, procede-se do seguinte modo: fornece-se alimento fresco em quantidade suficiente e retira-se o alimento velho bolorento; após uma semana, distribuem-se os juvenis por novas placas de Petri, mantendo uma densidade superior a 200.

▼M6

2.b) *Manipulação dos colêmbolos no início do ensaio*

— Recolhem-se os animais (com 9 a 12 dias no caso da *Folsomia candida* ou com 23 a 26 dias no caso da *Folsomia fimetaria*), por exemplo por aspiração, e transferem-se para um pequeno recipiente guarnecido com substrato humedecido de gesso e de carvão vegetal; verifica-se ao microscópio o estado físico em que se encontram, descartando-se os animais feridos ou lesionados. Realizam-se todas as etapas mantendo os colêmbolos numa atmosfera húmida — utilizando superfícies húmidas, por exemplo — para evitar *stress* hídrico.

— Vira-se o recipiente ao contrário e dão-se pequenas pancadas nele para transferir os colêmbolos para o solo. É necessário descarregar a eletricidade estática, caso contrário os animais poderiam ficar suspensos no ar ou aderentes ao recipiente de ensaio, acabando por secar. Para descarregar a eletricidade estática, pode colocar-se um ionizador ou um tecido húmido debaixo do recipiente.

— Distribui-se o alimento à superfície do solo, sem o amontoar.

— Durante o transporte e o ensaio é conveniente não dar pancadas nos recipientes de ensaio nem os perturbar de qualquer outro modo, pois isso poderia aumentar a compactação do solo e dificultar as interações dos colêmbolos.

3. **Outras espécies de colêmbolos possíveis**

Para a realização deste ensaio, podem ser utilizadas outras espécies de colêmbolos, como a *Proisotoma minuta*, a *Isotoma viridis*, a *Isotoma anglicana*, a *Orchesella cincta*, a *Sinella curviseta*, a *Paronychiurus kimi*, a *Orthonychiurus folsomi* e a *Mesaphorura macrochaeta*. A utilização de espécies alternativas está subordinada aos seguintes requisitos:

— identificação inequívoca da espécie;

— fundamentação da utilização da espécie;

— inclusão da biologia reprodutiva na fase de ensaio, para que a mesma possa constituir um alvo potencial durante a exposição;

— ciclo de vida conhecido: idade de maturação, duração do desenvolvimento dos ovos e estádios de desenvolvimento expostos;

— condições ótimas de crescimento e de reprodução proporcionadas pelo substrato utilizado no ensaio e pela alimentação fornecida;

— variabilidade suficientemente reduzida, para que possa estimar-se a toxicidade com precisão e exatidão.

▼M6

Apêndice 4

Retirada e contagem dos animais

1. **Distinguem-se dois métodos de retirada dos animais:**

1.a) Primeiro método: Utiliza-se um extrator com gradiente de temperatura regulado baseado nos princípios de MacFayden (1). O calor provém de um elemento térmico existente na parte superior da caixa de extração e é regulado por um termístor colocado na superfície da amostra de solo. A temperatura do líquido refrigerado que rodeia o recipiente de recolha é regulada por um termístor existente na superfície da caixa de recolha (situado abaixo do solo). Os termístores estão ligados a uma unidade reguladora programável que aumenta a temperatura segundo um programa pré-definido. Recolhem-se os animais na caixa de recolha arrefecida (2 °C), em cujo fundo se colocou uma camada de gesso de paris e carvão vegetal. Inicia-se a retirada a 25 °C e aumenta-se automaticamente a temperatura 5 °C de 12 em 12 horas, durante 48 horas. Após 12 horas a 40 °C, dá-se a retirada por terminada.

1.b) Segundo método: Após o período de incubação experimental, avalia-se pelo método de flutuação o número de colêmbolos juvenis presentes. Para isso, realiza-se o ensaio em recipientes com volume aproximado de 250 ml. No final do ensaio, adicionam-se aproximadamente 200 ml de água destilada. Para que os colêmbolos fiquem a flutuar, mexe-se suavemente o solo com um pequeno pincel. Para facilitar a contagem, aumentando o contraste entre a água e os colêmbolos (que são brancos), pode adicionar-se à água uma pequena quantidade (aproximadamente 0,5 ml) de pigmento fotográfico negro Kentmere. O pigmento não é tóxico para os colêmbolos.

2. **Contagem:**

Pode efetuar-se a contagem a olho nu ou com um microscópio ótico, após colocação de uma grelha por cima do recipiente de flutuação, ou fotografando a superfície de cada recipiente e contando posteriormente os colêmbolos em fotografias ampliadas ou diapositivos projetados. Também pode efetuar-se a contagem recorrendo a técnicas de digitalização de imagem (12). É necessário validar a técnica utilizada.

▼**M6**

Apêndice 5

Determinação da capacidade máxima de retenção de água do solo

Considera-se adequado o método a seguir descrito de determinação da capacidade máxima de retenção de água do solo. Consta do anexo C da norma ISO DIS 11268-2 [*Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*)*. Parte 2: *Determination of effects on reproduction*].

Utilizando um instrumento adequado (tubo helicoidal para recolha de amostras ou outro), recolhe-se uma quantidade definida (por exemplo 5 g) do solo que serve de substrato para o ensaio. Cobre-se o fundo do tubo com um pedaço de papel de filtro humedecido e coloca-se o tubo num suporte dentro de um banho de água. Imerge-se o tubo gradualmente, até que o nível da água fique acima do nível do solo. Deixa-se o tubo em água durante cerca de três horas. Uma vez que nem toda a água absorvida pelo solo por capilaridade pode ficar retida, deixa-se escorrer a amostra de solo durante duas horas, colocando o tubo em cima de um leito de areia quartzítica finamente moída muito humedecida, dentro de um recipiente tapado (para evitar a secagem). Em seguida, pesa-se a amostra e seca-se a mesma a 105 °C até massa constante. Calcula-se a capacidade de retenção de água (CRA) do seguinte modo:

$$\text{CRA (\% mássica no resíduo seco)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

em que:

S = massa do substrato saturado de água + massa do tubo + massa do papel de filtro,

T = tara (massa do tubo + massa do papel de filtro),

D = massa do resíduo seco do substrato.

▼**M6**

Apêndice 6

Determinação do pH do solo

O método de determinação do pH do solo a seguir descrito baseia-se na norma ISO DIS 10390: *Soil Quality — Determination of pH*.

Deixa-se secar à temperatura ambiente uma quantidade definida de solo durante, pelo menos, 12 horas. Prepara-se uma suspensão de, pelo menos, 5 g de solo em cinco vezes o volume deste de solução 1 M de cloreto de potássio (KCl) de qualidade analítica ou de solução 0,01 M de cloreto de cálcio ($CaCl_2$) de qualidade analítica. Agita-se vigorosamente a suspensão durante cinco minutos e deixa-se decantar durante, pelo menos, duas horas, mas não mais de 24 horas. Em seguida, mede-se o pH da fase líquida com um medidor de pH — previamente calibrado antes de cada medição, utilizando uma série adequada de soluções tampão (pH 4,0 e 7,0, por exemplo).

▼M6

C.40. ENSAIO DE TOXICIDADE NO CICLO DE VIDA EM QUIRONOMÍDEOS NUM SISTEMA SEDIMENTOS-ÁGUA COM SEDIMENTOS OU ÁGUA ENRIQUECIDOS

INTRODUÇÃO

1. Este método é equivalente ao *Test Guideline* TG 233 (2010) da OCDE. Foi concebido para avaliar os efeitos de uma exposição ao longo de todo o ciclo de vida dos dípteros de água doce *Chironomus* sp. a produtos químicos e cobre toda a 1.ª geração (geração P) e a fase inicial da vida da 2.ª geração (geração F1). Constitui uma extensão dos métodos de ensaio C.28 (1) ou C.27 (15), cujo cenário de exposição compreende, respetivamente, água enriquecida e sedimentos enriquecidos. Baseia-se nos atuais protocolos de ensaios de toxicidade para as espécies *Chironomus riparius* e *Chironomus dilutus* — anteriormente *Chironomus tentans* (2) –, que foram desenvolvidos na Europa e na América do Norte (3)(4)(5)(6)(7)(8)(9) e subsequentemente sujeitos a estudos interlaboratoriais comparativos (1)(7)(10)(11)(12). Podem também ser utilizadas outras espécies de quironomídeos bem documentadas, como a *Chironomus yoshimatsui* (13)(14). A duração da exposição completa é de cerca 44 dias no caso da *Chironomus riparius* e de cerca de 100 dias no caso da *Chironomus dilutus*.

2. Este método descreve tanto o cenário de exposição na água como o cenário de exposição nos sedimentos. A seleção do cenário de exposição adequado depende da finalidade do ensaio. O cenário de exposição na água, que envolve o enriquecimento da coluna de água no produto químico em estudo, tem por objetivo simular as perdas por dispersão na aplicação de pesticidas e abrange o pico de concentração inicial nas águas de superfície. O processo de enriquecimento da água também é útil para outros tipos de exposição (incluindo o derrame de produtos químicos), mas não se aplica a processos de acumulação em sedimentos mais demorados do que o período de ensaio. Neste último caso e também quando a principal via de chegada dos pesticidas às massas de água é por via de escorrências, pode ser mais adequado um cenário de sedimentos enriquecidos. Caso se perspetivem outros cenários de exposição, o planeamento do ensaio pode ser adaptado com facilidade. Por exemplo, se a repartição do produto químico em estudo entre a fase aquosa e a camada de sedimentos não for relevante e for necessário minimizar a adsorção aos sedimentos, pode utilizar-se em alternativa um sedimento artificial (areia quartzítica etc.).

3. Os produtos químicos a ensaiar em organismos que vivem nos sedimentos persistem, em geral, nos sedimentos por longos períodos. A exposição dos referidos organismos pode ter lugar por várias vias. A importância relativa de cada via de exposição, bem como o tempo de contribuição de cada uma delas para o efeito tóxico global, depende das propriedades físico-químicas do produto químico em causa. No caso de produtos químicos fortemente adsorventes e dos produtos químicos que se ligam aos sedimentos por ligações covalentes, a ingestão de alimentos contaminados pode constituir uma via de exposição significativa. Para não subestimar a toxicidade dos produtos químicos muito lipófilos, pode ponderar-se a adição de alimentos aos sedimentos antes da aplicação do produto químico em estudo (ver o ponto 31). Por conseguinte, podem ser contempladas todas as vias de exposição e todos os estádios do ciclo de vida.

4. Os parâmetros medidos são o número total de indivíduos adultos emergidos (da primeira e da segunda gerações), a taxa de desenvolvimento (idem), o rácio sexual dos indivíduos adultos totalmente emergidos e vivos (idem), o número de aglomerados de ovos por fêmea (unicamente da primeira geração) e a fertilidade desses aglomerados de ovos (unicamente da primeira geração).

5. Recomenda-se vivamente a utilização de sedimentos formulados, que apresentam várias vantagens relativamente aos sedimentos naturais:

▼M6

— variabilidade experimental reduzida, porque os sedimentos passam a constituir uma matriz «normalizada» reprodutível, eliminando-se a necessidade de encontrar fontes de sedimentos limpos e não-contaminados;

— possibilidade de iniciar os ensaios em qualquer momento, sem nenhuma variabilidade sazonal dos sedimentos ensaiados, não sendo também necessário pré-tratá-los para remover a fauna indígena;

— custo reduzido, comparativamente à colheita no terreno de quantidades suficientes de sedimentos para os ensaios de rotina;

— possibilidade de efetuar comparações de toxicidade entre vários estudos e de escalonar os produtos químicos em conformidade (3).

6. Definem-se no apêndice 1 alguns conceitos utilizados.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

7. Expõem-se larvas de quironomídeos do primeiro estádio larvar a uma gama de concentrações do produto químico em estudo num sistema sedimentos-água. Inicia-se o ensaio com a colocação de larvas do primeiro estádio larvar (1.ª geração) em copos de ensaio que contêm os sedimentos enriquecidos, ou então adiciona-se o produto químico em estudo à água depois de introduzidas as larvas nos copos. Determinam-se a emergência de quironomídeos, o tempo de emergência e o rácio sexual dos insetos totalmente emergidos e vivos. A fim de facilitar a enxameação, o acasalamento e a postura, transferem-se os adultos emergidos para gaiolas de criação. Determinam-se o número de aglomerados de ovos produzidos e a fertilidade dos mesmos. A partir desses aglomerados de ovos, obtêm-se larvas de 2.ª geração no primeiro estádio larvar. Colocam-se estas larvas em copos de ensaio preparados de fresco (procedimento de enriquecimento idêntico ao da 1.ª geração), para determinar a viabilidade da 2.ª geração por meio de uma avaliação da emergência, do tempo de emergência e do rácio sexual dos insetos totalmente emergidos e vivos (esquematiza-se no apêndice 5 este ensaio no ciclo de vida). Analisam-se os dados por recurso a um modelo de regressão, de forma a estimar a concentração que causaria uma redução de x % do parâmetro considerado, ou recorrendo a testes de hipóteses para determinar a NOEC. Este último método passa pela comparação, mediante testes estatísticos, das respostas à exposição ao produto químico em estudo com as respostas obtidas para o grupo de controlo adequado. Note-se que, no cenário da água enriquecida e no caso dos produtos químicos que se degradam rapidamente, os estádios do ciclo de vida mais adiantados de cada geração (por exemplo a fase de ninfa) podem estar expostos a concentrações consideravelmente mais baixas na água sobrenadante do que as larvas do primeiro estádio larvar. Nesta eventualidade e caso seja necessário um nível de exposição comparável em cada estádio do ciclo de vida, são de ponderar as seguintes adaptações do método de ensaio:

— realização de experiências paralelas, procedendo ao enriquecimento com o produto químico em estudo em diversos estádios do ciclo de vida, ou

— repetição do enriquecimento (ou renovação da água sobrenadante) do sistema de ensaio durante ambas as fases do ensaio (1.ª e 2.ª gerações), adaptando os intervalos entre enriquecimentos (renovações) ao devir característico do produto químico em estudo.

Estas adaptações só são realizáveis no cenário da água enriquecida; não o são no cenário dos sedimentos enriquecidos.

INFORMAÇÕES SOBRE O PRODUTO QUÍMICO EM ESTUDO

8. É necessário conhecer a hidrossolubilidade, a pressão de vapor e o log K_{ow} do produto químico em estudo, a partição deste nos sedimentos, medida ou calculada, e a estabilidade do mesmo na água e nos sedimentos. É necessário dispor de um método analítico fiável, com exatidão e limite de deteção conhecidos e referidos no relatório, para a determinação quantitativa do produto químico em estudo na água sobrenadante, na água

▼M6

dos poros e nos sedimentos. A fórmula estrutural e o grau de pureza do produto químico constituem igualmente informações úteis. O devir químico do produto químico em estudo (dissipação, degradação biótica ou abiótica etc.) é outra informação útil. Para mais orientações sobre o ensaio de produtos químicos cujas propriedades físico-químicas dificultam a realização dos ensaios, pode consultar-se a referência (16).

PRODUTOS QUÍMICOS DE REFERÊNCIA

9. Para ter a certeza de que a sensibilidade da população do laboratório não sofreu alterações, pode proceder-se ao ensaio periódico de produtos químicos de referência. Tal como no caso das dáfnias, seria suficiente um ensaio de toxicidade aguda às 48 horas (17). Todavia, enquanto não se dispõe de orientações validadas para o ensaio de toxicidade aguda, é de ponderar a realização de um ensaio de toxicidade crónica de acordo com o capítulo C.28 deste anexo. São exemplos de produtos químicos tóxicos de referência utilizados com êxito em estudos interlaboratoriais comparativos e estudos de validação o lindano, a trifluralina, o pentaclorofenol, o cloreto de cádmio e o cloreto de potássio (1)(3)(6)(7)(18).

VALIDADE DO ENSAIO

10. Para que um ensaio possa considerar-se válido, têm de ser cumpridas as seguintes condições:

— a emergência média no grupo de controlo no final do período de exposição é, pelo menos, de 70 % para ambas as gerações (1)(7);

— no caso da *Chironomus riparius* e da *Chironomus yoshimatsui*, 85 % do total de emersões de insetos adultos no grupo de controlo ocorrem, em ambas as gerações, 12 a 23 dias após a introdução, nos recipientes de ensaio, das larvas do primeiro estádio larvar; no caso da *Chironomus dilutus*, é aceitável um período de 20 a 65 dias;

— o rácio sexual médio dos indivíduos adultos totalmente emergidos e vivos (proporção de fêmeas ou de machos) no grupo de controlo é, pelo menos, de 0,4, mas não superior a 0,6, em ambas as gerações;

— em cada gaiola de criação dos grupos de controlo da 1.ª geração, o número de aglomerados de ovos é, pelo menos, de 0,6 por fêmea nela introduzida;

— em cada gaiola de criação dos grupos de controlo da 1.ª geração, a fração de aglomerados de ovos férteis é, pelo menos, de 0,6;

— no termo do período de exposição de ambas as gerações, medem-se em cada recipiente de ensaio o pH e a concentração de oxigénio dissolvido; em todos os recipientes de ensaio, a concentração de oxigénio é, pelo menos, de 60 % do valor da saturação com ar (VSA ([1])) e o pH da água sobrenadante está compreendido entre 6 e 9;

— a temperatura da água não varia mais de ±1,0 °C.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Recipientes de ensaio e gaiolas de criação

11. Expõem-se as larvas em copos de vidro de 600 ml com cerca de 8,5 cm de diâmetro (ver o apêndice 5). Podem ser utilizados outros recipientes que possibilitem uma espessura adequada da água sobrenadante e dos sedimentos. A superfície dos sedimentos deve ser suficiente para proporcionar 2 a 3 cm^2 por larva. A razão entre a espessura da camada de sedimentos e a espessura da água sobrenadante deve ser de aproximadamente 1:4. Utilizam-se gaiolas de criação (mínimo de 30 cm para cada

([1]) A 20 °C e à pressão atmosférica normal, o VSA da água doce é de 9,1 mg/l (60 % deste valor correspondem a 5,46 mg/l).

▼M6

uma das três dimensões) dotadas de uma tela (malha de aproximadamente 1 mm) na parte superior e, pelo menos, num dos lados (ver o apêndice 5). Tendo em vista a postura dos ovos, coloca-se em cada gaiola uma placa de cristalização de 2 l com os sedimentos e a água preparados para o ensaio. Também na placa de cristalização a razão entre a espessura da camada de sedimentos e a espessura da água sobrenadante deve ser de aproximadamente 1:4. Transferem-se os aglomerados de ovos da placa de cristalização para placas de microtitulação com doze alvéolos (um aglomerado de ovos por alvéolo, contendo este pelo menos 2,5 ml de água enriquecida proveniente da placa de cristalização) e cobrem-se as placas de microtitulação com uma tampa, para evitar que ocorra evaporação significativa. Podem ser utilizados outros recipientes para conservar os aglomerados de ovos. Com exceção das placas de microtitulação, os recipientes de ensaio e os outros equipamentos que entram em contacto com o sistema de ensaio devem ser exclusivamente de vidro ou de outro material quimicamente inerte (por exemplo politetrafluoroetileno).

Escolha da espécie

12. De preferência, utiliza-se no ensaio a espécie *Chironomus riparius*, embora também possa utilizar-se a *Chironomus yoshimatsui*. A espécie *Chironomus dilutus* também é adequada, mas é mais difícil de manipular e exige um período de ensaio mais longo. O apêndice 2 descreve o método de cultura da *Chironomus riparius*. Dispõe-se igualmente de informações sobre as condições de cultura da *Chironomus dilutus* (5) e da *Chironomus yoshimatsui* (14). Deve confirmar-se a identidade da espécie antes de cada ensaio, exceto se os organismos provierem de uma cultura interna do laboratório.

Sedimentos

13. De preferência, utilizam-se sedimentos formulados (igualmente designados por sedimentos reconstituídos, artificiais ou sintéticos). Contudo, se forem utilizados sedimentos naturais, estes devem ser caracterizados (pelo menos pH e teor de carbono orgânico, recomendando-se a determinação de outros parâmetros, como a razão C/N e a granulometria) e devem estar isentos de qualquer contaminação e de outros organismos que possam competir com as larvas de quironomídeos ou comê-las. Recomenda-se igualmente que os sedimentos sejam mantidos durante sete dias em condições idênticas às que se verificarão durante o ensaio a realizar. Recomenda-se (1)(20)(21) a seguinte composição de sedimentos formulados, descrita em (1):

a) 4-5 % (peso seco) de turfa: pH tão próximo quanto possível de 5,5 a 6,0; é importante utilizar turfa em pó finamente moída (granulometria ≤1 mm), seca unicamente ao ar;

b) 20 % (peso seco) de argila caulínica, de preferência com teor de caulinite superior a 30 %;

c) 75-76 % (peso seco) de areia quartzítica (com predominância de areia fina, com mais de 50 % de partículas de granulometria compreendida entre 50 μm e 200 μm);

d) quantidade de água desionizada necessária para que o teor de humidade da mistura final se situe na gama 30–50 %;

e) quantidade de carbonato de cálcio ($CaCO_3$) quimicamente puro necessária para ajustar o pH da mistura final dos sedimentos a 7,0 ± 0,5;

f) teor de carbono orgânico da mistura final: 2 % ± 0,5 %, a ajustar por recurso a quantidades adequadas de turfa e areia, em conformidade com as alíneas a) e c).

14. As origens da turfa, da argila caulínica e da areia devem ser conhecidas. Deve confirmar-se a ausência de contaminação química (metais pesados,

▼M6

compostos organoclorados, compostos organofosforados etc.) nos componentes dos sedimentos. Exemplifica-se no apêndice 3 a preparação de sedimentos formulados. Uma mistura de componentes secos também é aceitável caso se demonstre que, após a adição da água sobrenadante, não ocorre separação de componentes dos sedimentos (por exemplo, partículas de turfa flutuantes) e que a turfa ou os sedimentos são suficientemente condicionados.

Água

15. Qualquer água com as características químicas de uma água de diluição aceitável enunciadas nos apêndices 2 e 4 é adequada para o ensaio. Para a cultura e o ensaio, é aceitável qualquer água adequada, seja água natural (superficial ou subterrânea), água reconstituída (ver o apêndice 2) ou água da torneira desclorada, desde que os quironomídeos nela sobrevivam durante todo o período de cultura e de ensaio sem evidenciarem sinais de *stress*. No início do ensaio, o pH da água nele utilizada deve estar compreendido entre 6 e 9 e a dureza total da água, expressa em $CaCO_3$, não deve exceder 400 mg/l. No entanto, caso se suspeite de uma interação entre os iões responsáveis pela dureza e o produto químico em estudo, deve utilizar-se uma água mais macia (nessa eventualidade, não pode utilizar-se o meio Elendt M4). Deve utilizar-se o mesmo tipo de água em todo o estudo. As características de qualidade da água indicadas no apêndice 4 devem ser determinadas, pelo menos, duas vezes por ano ou sempre que se suspeite que tenham mudado significativamente.

Soluções de reserva — água enriquecida

16.a) Calculam-se as concentrações de ensaio com base nas concentrações da água da coluna de água, ou seja, da água sobrenadante aos sedimentos. De modo geral, preparam-se as soluções de ensaio com as concentrações escolhidas por diluição de uma solução de reserva. De preferência, preparam-se as soluções de reserva por dissolução, na água utilizada no ensaio, do produto químico em estudo. Em alguns casos, pode ser necessário utilizar solventes ou dispersantes para obter uma solução de reserva com a concentração adequada. A acetona, os éteres mono e dimetílico do etilenoglicol, a dimetilformamida e o trietilenoglicol constituem exemplos de solventes adequados. No que respeita aos dispersantes, podem ser utilizados o Cremophor RH40, o Tween 80, a metilcelulose a 0,01 % e o HCO-40. A concentração do agente solubilizante no meio de ensaio final deve ser mínima (ou seja, $\leq$ 0,1 ml/l) e deve ser a mesma para todas as concentrações de exposição. Caso se utilize um agente solubilizante, o agente em causa não deve ter efeitos com significância na sobrevivência, a confirmar por comparação de um grupo de controlo do solvente com um grupo de controlo negativo (da água) No entanto, deve evitar-se ao máximo utilizar tais produtos.

Soluções de reserva — sedimentos enriquecidos

16.b) O enriquecimento dos sedimentos nas concentrações escolhidas é geralmente efetuado por adição direta aos sedimentos de uma solução do produto químico em estudo. Com o auxílio de um moinho de rolos ou de um misturador de alimentos, ou manualmente, misturam-se os sedimentos formulados com solução de reserva do produto químico em estudo dissolvido em água desionizada. Se o produto químico for pouco solúvel em água, pode dissolver-se o mesmo no menor volume possível de um solvente orgânico adequado (por exemplo hexano, acetona ou clorofórmio). Seguidamente, mistura-se esta solução com 10 g de areia quartzítica fina por recipiente de ensaio. Deixa-se evaporar o solvente até ser totalmente removido da areia e mistura-se então esta com a quantidade adequada de sedimentos. Para solubilizar, dispersar ou emulsionar o produto químico em estudo, apenas podem ser utilizados agentes muito voláteis. Ao preparar os sedimentos, há que ter em conta a areia que é misturada

▼M6

com o produto químico (ou seja, deve utilizar-se menos areia na preparação dos sedimentos). Deve ter-se o cuidado de assegurar uma distribuição completa e uniforme do produto químico nos sedimentos aos quais este é adicionado. Se necessário, pode recorrer-se à análise de subamostras para determinar o grau de homogeneidade.

PLANEAMENTO DO ENSAIO

17. Consiste na escolha do número de concentrações a ensaiar e do intervalo entre elas, do número de recipientes para cada concentração, do número de larvas por recipiente e do número de placas de cristalização e de gaiolas de criação. Descreve-se a seguir o protocolo de determinação de CE_x e de NOEC, bem como de realização de ensaios do limite.

Análise por regressão

18. O ensaio deve abranger a concentração com efeitos CE_x e a gama de concentrações na qual o produto químico em estudo tem efeitos significativos, de modo que o parâmetro escolhido não seja obtido por extrapolação além dos limites dos dados obtidos. São de evitar extrapolações muito abaixo da concentração mais baixa ou muito acima da concentração mais elevada. Para escolher uma gama adequada de concentrações a ensaiar, pode ser útil realizar um ensaio exploratório preliminar da gama de concentrações a utilizar.

19. Para determinar uma CE_x, são necessários, pelo menos, cinco concentrações diferentes e oito replicados de cada uma delas. Utilizam-se duas gaiolas de criação (A e B) para cada concentração. Dividem-se os oito replicados em dois grupos de quatro, sendo um associado a uma das gaiolas e o outro à outra. Procede-se a esta agregação de replicados devido ao número de insetos que é necessário ter em cada gaiola para uma avaliação fiável da reprodução. Constituem-se igualmente oito replicados na 2.ª geração, obtidos a partir das populações expostas nas gaiolas de criação. O fator entre concentrações consecutivas não deve ser superior a dois (salvo se a curva dose-resposta tiver um declive reduzido). Caso se ensaie um número maior de concentrações com respostas diferentes, pode reduzir-se a seis o número de replicados correspondente a cada nível de exposição (três replicados em cada gaiola de criação). O aumento do número de replicados ou a redução do intervalo entre concentrações consecutivas ensaiadas tende a estreitar o intervalo de confiança em volta da CE_x.

Estimativa da NOEC/LOEC

20. Para determinar uma NOEC, são necessários cinco concentrações diferentes e, pelo menos, oito replicados de cada uma delas (4 para a gaiola de criação A e 4 para a gaiola de criação B) e o fator entre concentrações consecutivas não deve ser superior a dois. O número de replicados deve ser suficiente para detetar estatisticamente uma diferença de 20 % relativamente ao grupo de controlo, com um grau de significância de 5 % (α = 0,05). Para a taxa de desenvolvimento, a fecundidade e a fertilidade, é normalmente adequada uma análise de variância (ANOVA), seguida de um teste de Dunnett ou de um teste de Williams (22)(23)(24)(25). Para a taxa de emergência e o rácio sexual, podem ser adequados o teste de Cochran-Armitage, o teste exato de Fisher (com a correção de Bonferroni) ou o teste de Mantel-Haentzal.

Ensaio do limite

21. Caso não se observem efeitos à concentração máxima no ensaio exploratório facultativo preliminar da gama de concentrações a utilizar, pode efetuar-se um ensaio do limite (ensaio de uma concentração e de ou mais grupos de controlo). O objetivo do ensaio do limite consiste em obter a indicação de que os eventuais efeitos tóxicos do produto químico em estudo ocorrem a concentrações superiores à concentração-limite ensaiada. As concentrações recomendadas são 100 mg/l para a água e 1 000 mg/kg (peso seco) para os sedimentos. Em geral, são necessários, pelo menos, oito replicados de exposição e oito replicados de controlo. Deve

▼M6

demonstrar-se ser possível detetar estatisticamente uma diferença de 20 % relativamente ao grupo de controlo, com um grau de significância de 5 % (α = 0,05). No caso das respostas mensuráveis (por exemplo a taxa de desenvolvimento), o teste t é um método estatístico adequado se os dados satisfizerem os requisitos deste teste (normalidade, variâncias homogéneas). Se esses requisitos não estiverem preenchidos, pode utilizar-se um teste t de variância desigual ou um teste não-paramétrico, como o teste de Wilcoxon-Mann-Whitney. O teste exato de Fisher é adequado para a taxa de emergência.

PROCEDIMENTO DE ENSAIO

Condições de exposição

Preparação do sistema água-sedimentos (enriquecimento da água)

22.a) Coloca-se em cada recipiente de ensaio e em cada placa de cristalização a quantidade de sedimentos formulados (ver os pontos 13 e 14 e o apêndice 3) necessária para constituir uma camada de espessura compreendida entre 1,5 cm (podendo ser um pouco menos nas placas de cristalização) e 3 cm. Adiciona-se água (ver o ponto 15) de modo que a razão entre a espessura da camada de sedimentos e a espessura da camada de água não exceda 1:4. Depois da preparação dos recipientes de ensaio e antes de neles se introduzirem as larvas do primeiro estádio larvar da 1.ª ou 2.ª gerações, deixam-se os sistemas sedimentos-água sob arejamento ligeiro durante aproximadamente sete dias (ver o ponto 14 e o apêndice 3). Durante o ensaio, não se areja o sistema sedimentos-água das placas de cristalização, pois este não tem de sustentar a sobrevivência das larvas (recolhem-se os aglomerados de ovos antes da eclosão). Para evitar a separação de componentes dos sedimentos e a ressuspensão de finos durante a criação da coluna de água, enquanto a água é vertida os sedimentos podem ser cobertos com um disco de plástico, que se remove imediatamente a seguir. Podem ser igualmente adequados outros dispositivos.

Preparação do sistema água-sedimentos (enriquecimento dos sedimentos)

22.b) Colocam-se nos recipientes de ensaio e nas placas de cristalização os sedimentos enriquecidos preparados de acordo com o ponto 16.b) e adiciona-se água de modo a formar uma camada sobrenadante com a razão volúmica 1:4 entre os sedimentos e a água. A espessura da camada de sedimentos deve estar compreendida entre 1,5 cm e 3 cm (podendo ser um pouco menos nas placas de cristalização). Para evitar a separação de componentes dos sedimentos e a ressuspensão de finos durante a criação da coluna de água, enquanto a água é vertida os sedimentos podem ser cobertos com um disco de plástico, que se remove imediatamente a seguir. Podem ser igualmente adequados outros dispositivos. Uma vez preparados os sedimentos enriquecidos com a fase aquosa sobrenadante, é conveniente permitir a repartição do produto químico em estudo entre a fase aquosa e os sedimentos (4)(5)(7)(18). Esta repartição deve ocorrer, de preferência, às condições de temperatura e arejamento utilizadas no ensaio. O tempo necessário para atingir o equilíbrio depende dos sedimentos e do produto químico em causa, podendo variar de algumas horas a vários dias e mesmo, em casos raros, chegar a ser de 5 semanas. Dado que, nesse período, muitos produtos químicos poderiam degradar-se, não se espera até atingir o equilíbrio, recomendando-se um período de equilibração de 48 horas. Todavia, quando se sabe que o período de semidegradação do produto químico em causa nos sedimentos é longo (ver o ponto 8), pode dilatar-se o período de equilibração. No final deste período de equilibração, mede-se a concentração do produto químico em estudo na água sobrenadante, na água dos poros e nos sedimentos, pelo menos no caso da concentração mais elevada e de uma concentração menor (ver o ponto 38). Estas determinações analíticas do produto químico permitem efetuar o balanço de massas e exprimir os resultados com base em concentrações medidas.

23. Cobrem-se os recipientes de ensaio (por exemplo com placas de vidro). Se necessário, o nível inicial de água pode ser reposto durante o ensaio, para compensar a evaporação. Para tal, utiliza-se água destilada ou desionizada, de modo a evitar a acumulação de sais. Não é necessário cobrir as placas

▼M6

de cristalização colocadas nas gaiolas de criação, embora possa repor-se o nível inicial de água para compensar as perdas durante o período de ensaio; porém, esta reposição não é indispensável, porque os aglomerados de ovos só estão em contacto com a água cerca de um dia e estas placas só são utilizadas durante uma curta fase do ensaio.

Introdução dos organismos utilizados no ensaio

24. Quatro a cinco dias antes da introdução das larvas do primeiro estádio larvar da 1.ª geração, transferem-se os aglomerados de ovos da cultura para pequenos recipientes com meio de cultura. Pode utilizar-se meio proveniente da cultura de reserva ou um meio preparado recentemente. Em qualquer dos casos, adiciona-se uma pequena quantidade de alimento ao meio de cultura, por exemplo algumas gotículas de filtrado de uma suspensão de flocos de alimento para peixes finamente moídos (ver o apêndice 2). Apenas devem ser utilizados aglomerados de ovos de postura recente. Normalmente, as larvas começam a eclodir alguns dias após a postura dos ovos (2 a 3 dias no caso da *Chironomus riparius* a 20 °C e 1 a 4 dias no caso da *Chironomus dilutus* a 23 °C e da *Chironomus yoshimatsui* a 25 °C), e passam depois por quatro estádios de crescimento, cada um dos quais com a duração de 4 a 8 dias. Utilizam-se no ensaio larvas do primeiro estádio larvar (máximo 48 h após a eclosão). O estádio de desenvolvimento larvar em que se encontram as larvas pode, eventualmente, ser verificado por exame da largura da cápsula cefálica (7).

25. Com o auxílio de uma pipeta embotada, colocam-se vinte larvas do primeiro estádio larvar da 1.ª geração, escolhidas aleatoriamente, em cada recipiente de ensaio já com o sistema sedimentos-água. Suspende-se o arejamento da água durante a transferência das larvas para os recipientes de ensaio e as 24 horas subsequentes (ver o ponto 32). Consoante o tipo de ensaio realizado (ver os pontos 19 e 20), o número mínimo de larvas por nível de concentração é de 120 (6 replicados por nível de concentração) para a determinação da CE_x e de 160 para a determinação da NOEC (8 replicados por nível de concentração). No protocolo de ensaio com sedimentos enriquecidos, a exposição inicia-se com a transferência das larvas para os recipientes de ensaio.

Enriquecimento da água sobrenadante

26. Vinte e quatro horas após a transferência das larvas do primeiro estádio larvar da 1.ª geração, adiciona-se o produto químico em estudo à coluna de água sobrenadante e reinicia-se um arejamento ligeiro (para possíveis adaptações do protocolo de ensaio, ver o ponto 7). Com o auxílio de uma pipeta, injetam-se na água, abaixo da superfície, pequenos volumes da solução de reserva do produto químico em estudo. Em seguida, homogeneíza-se a água sobrenadante com cuidado, para não revolver os sedimentos. No protocolo de ensaio com água enriquecida, a exposição inicia-se com o enriquecimento da água (ou seja, um dia após a transferência das larvas para os recipientes de ensaio).

Recolha dos adultos emergidos

27. Utilizando um aspirador, um exaustor ou dispositivo semelhante (ver o apêndice 5), retiram-se dos recipientes de ensaio os insetos emergidos da 1.ª geração uma ou, de preferência, duas vezes por dia (ver o ponto 36). Devem ser tomadas as precauções necessárias para não lesionar os insetos. Transferem-se os insetos retirados de quatro dos recipientes de ensaio com o mesmo nível de exposição para a gaiola de criação à qual foram previamente destinados. No dia em que emergem os primeiros insetos (machos), enriquece-se a água das placas de cristalização injetando na água com uma pipeta, abaixo da superfície, um pequeno volume da solução de reserva do produto químico em estudo (protocolo com água enriquecida). Em seguida, homogeneíza-se a água sobrenadante com cuidado, para não revolver os sedimentos. O valor nominal da concentração do produto químico em estudo em cada placa de cristalização é idêntico ao da concentração do mesmo nos recipientes de exposição associados à gaiola de criação em causa. No caso do protocolo dos sedimentos enriquecidos,

▼M6

preparam-se as placas de cristalização cerca de 11 dias após o início da exposição (ou seja, da transferência das larvas da 1.ª geração), a fim de que possa estabelecer-se um equilíbrio durante cerca de 48 horas, antes da postura dos primeiros aglomerados de ovos.

28. Utilizando uma pinça ou uma pipeta embotada, retiram-se os aglomerados de ovos das placas de cristalização da gaiola de criação. Transfere-se cada aglomerado de ovos para um recipiente onde se colocou meio de cultura da placa de cristalização de proveniência dos ovos (por exemplo um alvéolo de uma placa de microtitulação com 12 alvéolos, no qual se colocaram, pelo menos, 2,5 ml de meio de cultura). Para evitar evaporação significativa, tapam-se com uma tampa os recipientes nos quais foram introduzidos os aglomerados de ovos. Mantêm-se os aglomerados de ovos sob observação durante, pelo menos, seis dias após a postura, para que se lhes possa atribuir a classificação de férteis ou inférteis.

Para iniciar a 2.ª geração, selecionam-se em cada gaiola de criação pelo menos três, mas de preferência seis, aglomerados férteis de ovos, que se deixam eclodir na presença de um pouco de alimento. A postura destes aglomerados de ovos deve ter ocorrido no pico da postura, o qual, nos recipientes de controlo, normalmente ocorre cerca do 19.º dia de ensaio. O ideal é que a 2.ª geração se inicie no mesmo dia para todos os níveis de exposição; porém, devido aos efeitos do produto químico no desenvolvimento das larvas, isto nem sempre é possível. Nesse caso, pode começar-se pelas concentrações mais baixas e pelo grupo de controlo (do solvente), passando depois às concentrações mais elevadas.

29.a) No protocolo com água enriquecida, prepara-se o sistema sedimentos-água para a 2.ª geração injetando o produto químico em estudo na coluna de água sobrenadante cerca de uma hora antes da transferência das larvas do primeiro estádio larvar para os recipientes de ensaio. Com o auxílio de uma pipeta, injetam-se na água, abaixo da superfície, pequenos volumes das soluções do produto químico em estudo. Em seguida, homogeneíza-se a água sobrenadante com cuidado, para não revolver os sedimentos. Depois do enriquecimento da água, dá-se início a um ligeiro arejamento.

29.b) No protocolo com sedimentos enriquecidos, preparam-se os recipientes de exposição com o sistema sedimentos-água para a 2.ª geração do mesmo modo que para a 1.ª geração.

30. Com o auxílio de uma pipeta embotada, colocam-se vinte larvas do primeiro estádio larvar (no máximo 48 h após a eclosão) da 2.ª geração, escolhidas aleatoriamente, em cada recipiente de ensaio já com o sistema sedimentos-água enriquecido. Suspende-se o arejamento da água durante a transferência das larvas do primeiro estádio larvar para os recipientes de ensaio e as 24 horas subsequentes. Consoante o tipo de ensaio realizado (ver os pontos 19 e 20), o número mínimo de larvas por nível de concentração é de 120 (6 replicados por nível de concentração) para a determinação da CE_x e de 160 para a determinação da NOEC (8 replicados por nível de concentração).

Alimentação

31. É necessário alimentar as larvas dos recipientes de ensaio, de preferência diariamente, mas, pelo menos, três vezes por semana. Uma quantidade diária por larva de 0,25 mg a 0,5 mg (0,35 mg a 0,5 mg no caso da *Chironomus yoshimatsui*) de alimento para peixes (suspenso em água ou finamente moído, por exemplo Tetra Min ou Tetra Phyll — para mais informações, ver o apêndice 2) é adequada para larvas jovens, nos primeiros dez dias de desenvolvimento. Após este período, as larvas podem precisar de mais alimento: 0,5 mg a 1,0 mg diários por larva devem ser suficientes durante o resto do ensaio. Deve reduzir-se a ração alimentar de todos os grupos expostos e de controlo nos quais se observe desenvolvimento de fungos ou caso se verifique mortalidade nos grupos de controlo. Se não for possível eliminar o desenvolvimento de fungos, deve repetir-se o ensaio.

A relevância toxicológica da via de exposição por ingestão é geralmente maior no caso dos produtos químicos com elevada afinidade por carbono orgânico e dos produtos químicos que formem ligações covalentes com os

▼M6

sedimentos. Portanto, ao ensaiar produtos químicos com essas propriedades, pode adicionar-se a quantidade de alimento necessária para a sobrevivência e o crescimento natural das larvas aos sedimentos formulados antes do período de estabilização, conforme o imponha a regulamentação. Para evitar a deterioração da qualidade da água, devem ser utilizadas matérias vegetais em vez de alimentos para peixes; por exemplo, 0,5 % (peso seco) de folhas finamente moídas de espécies como a urtiga comum (*Urtica dioica*), a amoreira (*Morus alba*), o trevo branco (*Trifolium repens*) ou o espinafre (*Spinacia oleracea*) ou outras matérias de origem vegetal (Cerophyl ou α-celulose). A incorporação nos sedimentos da quantidade total de um alimento orgânico antes do enriquecimento daqueles com o produto químico em estudo não deixa de influenciar a qualidade da água e as funções biológicas (21) nem é método normalizado, mas estudos recentes revelaram que funciona (19)(26). Os insetos adultos das gaiolas de criação normalmente não necessitam de alimentação, mas a fecundidade e a fertilidade são favorecidas quando se coloca na gaiola, como fonte alimentar para os adultos emergidos, um tampão de algodão embebido numa solução saturada de sacarose (34).

Condições de incubação

32. Inicia-se um arejamento ligeiro da água sobrenadante nos recipientes de ensaio 24 horas após a introdução das larvas do primeiro estádio larvar, de ambas as gerações, o qual se mantém até ao final do ensaio (a concentração de oxigénio dissolvido não pode descer abaixo de 60 % do valor da saturação com ar). Procede-se ao arejamento à razão de algumas bolhas por segundo, mergulhando a ponta de uma pipeta de Pasteur de vidro 2 cm a 3 cm acima da camada de sedimentos. Quando se ensaiam produtos químicos voláteis, é de ponderar não arejar o sistema sedimentos-água, mas sem que deixe de ser cumprido o critério de validade mínimo de 60 % do valor da saturação com ar (ponto 10). Para mais orientações, pode consultar-se a referência (16).

33. Os ensaios com a espécie *Chironomus riparius* realizam-se à temperatura constante de 20 °C (± 2 °C). No caso das espécies *Chironomus tentans* e *Chironomus yoshimatsui*, as temperaturas recomendadas são 23 °C e 25 °C (± 2 °C), respetivamente. Utiliza-se um fotoperíodo de 16 horas, com uma intensidade luminosa de 500 lux a 1 000 lux. No caso das gaiolas de criação, pode incluir-se uma fase de alvorada e uma fase de crepúsculo com a duração de uma hora.

Período de exposição

34. Protocolo com água enriquecida: O período de exposição da 1.ª geração tem início quando se injeta o produto químico em estudo na água sobrenadante dos recipientes de ensaio (operação realizada um dia após a introdução das larvas — ver no ponto 7 eventuais alterações do protocolo de exposição). A exposição das larvas da 2.ª geração inicia-se imediatamente, uma vez que aquelas são inseridas num sistema sedimentos-água já enriquecido no produto químico em estudo. Nos ensaios com as espécies *Chironomus riparius* ou *Chironomus yoshimatsui*, o período máximo de exposição é de 27 dias, no caso da 1.ª geração, e de 28 dias, no caso da 2.ª geração (as larvas da 1.ª geração passam nos recipientes um dia sem serem expostas). Tendo em conta a sobreposição parcial, a duração total do ensaio é de aproximadamente 44 dias. No caso da espécie *Chironomus dilutus*, o período máximo de exposição é de 64 dias para a 1.ª geração e de 65 dias para a 2.ª geração. A duração total do ensaio é de 100 dias, aproximadamente.

Protocolo com sedimentos enriquecidos: A exposição inicia-se com a introdução das larvas; no caso de ambas as gerações das espécies *Chironomus riparius* e *Chironomus yoshimatsui*, prolonga-se, no máximo, por 28 dias; no caso de ambas as gerações da espécie *Chironomus dilutus*, prolonga-se, no máximo, por 65 dias.

Exames

Emergência

35. Determinam-se para ambas as gerações o tempo de desenvolvimento e o número de insetos machos e fêmeas totalmente emergidos e vivos. Distinguem-se facilmente os machos pelas suas antenas plumosas e pelo seu corpo fino.

▼M6

36. Pelo menos três vezes por semana, examinam-se visualmente os recipientes de ensaio correspondentes a ambas as gerações para verificar se as larvas manifestam algum comportamento anormal (saída dos sedimentos, natação inabitual etc.) comparativamente ao grupo de controlo. Durante o período de emergência, iniciado cerca de 12 dias após a introdução das larvas de *Chironomus riparius* e *Chironomus yoshimatsui* e cerca de 20 dias após a introdução das larvas de *Chironomus dilutus*, contam-se os insetos emergidos e determina-se o sexo de cada um deles pelo menos uma vez por dia, mas, de preferência, duas vezes por dia (de manhã cedo e ao fim da tarde). Após a identificação, transferem-se cuidadosamente os insetos da 1.ª geração para a gaiola de criação. Depois de identificados, retiram-se e matam-se os insetos da 2.ª geração. Transfere-se cada um dos aglomerados de ovos depositados nos recipientes de ensaio da 1.ª geração, juntamente com, pelo menos, 2,5 ml de água nativa, para placas de microtitulação de 12 alvéolos (ou outros recipientes adequados), que em seguida se cobrem com uma tampa, para evitar evaporação significativa. Regista-se igualmente o número de larvas mortas e de ninfas visíveis que não emergiram. O apêndice 5 apresenta exemplos de uma gaiola de criação, de um recipiente de ensaio e de um exaustor.

Reprodução

37. Avaliam-se os efeitos na reprodução através do número de aglomerados de ovos produzidos pela 1.ª geração de insetos e da fertilidade desses aglomerados. Uma vez por dia, recolhem-se os aglomerados da placa de cristalização colocada em cada gaiola de criação. Transferem-se os aglomerados de ovos juntamente com, pelo menos, 2,5 ml de água nativa, para placas de microtitulação de 12 alvéolos (um aglomerado por alvéolo) ou outros recipientes adequados, que em seguida se cobrem com uma tampa, para evitar evaporação significativa. Registam-se as seguintes características de cada aglomerado: dia de produção, tamanho (normal, ou seja, 1,0 cm ± 0,3 cm, ou pequeno, normalmente ≤ 0,5 cm), estrutura (normal: cordão espiralado de ovos em forma de banana; ou anormal: por exemplo cordão de ovos não espiralado) e fertilidade (fértil ou infértil). Avalia-se a fertilidade de cada aglomerado de ovos durante o período de seis dias subsequente à postura. Considera-se um aglomerado fértil se, pelo menos, um terço dos ovos eclodir. Utiliza-se o número de fêmeas transferidas para a gaiola de criação para calcular o número de aglomerados de ovos por fêmea e o número de aglomerados de ovos férteis por fêmea. Se necessário, pode determinar-se o número de ovos de um aglomerado pelo método não destrutivo da contagem em anéis — descrito nas referências (32) e (33).

Determinações analíticas

Concentração do produto químico em estudo

38. No mínimo, analisam-se amostras da água sobrenadante, da água dos poros e dos sedimentos, correspondentes à concentração mais elevada e a uma concentração inferior, no início da exposição (no caso do protocolo de enriquecimento da água, de preferência uma hora após a injeção do produto químico em estudo) e no final do ensaio. Esta recomendação aplica-se aos recipientes de ambas as gerações. Das placas de cristalização das gaiolas de criação apenas se analisa a água sobrenadante, pois é com esta que os aglomerados de ovos entram em contacto (no caso do protocolo dos sedimentos enriquecidos, é de ponderar uma confirmação analítica da concentração dos sedimentos). Durante o ensaio, podem ser realizadas outras determinações consideradas necessárias aos sedimentos, à água dos poros e à água sobrenadante. Estas determinações da concentração do produto químico em estudo proporcionam informações sobre o comportamento deste e/ou a repartição do mesmo no sistema água-sedimentos. A colheita de amostras dos sedimentos e da água dos poros no início e no decurso do ensaio (ver o ponto 39) exige recipientes de ensaio adicionais para as determinações analíticas. Se a repartição do produto químico em estudo entre a água e os sedimentos tiver sido determinada

▼M6

com clareza num estudo água/sedimentos em condições comparáveis (no tocante a proporção relativa de água e de sedimentos, tipo de aplicação, teor de carbono orgânico dos sedimentos etc.) ou se as concentrações medidas da água sobrenadante se mantiverem comprovadamente entre 80 % e 120 % das concentrações nominais ou medidas iniciais, pode não ser necessário efetuar determinações nos sedimentos no caso do protocolo da água enriquecida.

39. Quando se efetuam medições intermédias (por exemplo no 7.º e/ou no 14.º dias) e a análise necessita de amostras grandes que não possam ser colhidas dos recipientes de ensaio sem influenciar o sistema de ensaio, as determinações analíticas devem ser realizadas com amostras colhidas de recipientes de ensaio adicionais tratados da mesma forma (incluindo a presença dos organismos), mas não utilizados nos exames biológicos.

40. A centrifugação a 10 000 g, a 4 °C, durante 30 minutos, por exemplo, é o procedimento recomendado para isolar a água intersticial (água dos poros). No entanto, caso se demonstre que o produto químico em estudo não é adsorvido pelos filtros, a filtragem também é aceitável. Em alguns casos, se a amostra for demasiado pequena, pode não ser possível analisar concentrações na água dos poros.

Parâmetros físico-químicos

41. Determinam-se de modo adequado (ver o ponto 10) o pH, o oxigénio dissolvido na água utilizada no ensaio e a temperatura da água nos recipientes de ensaio e nas placas de cristalização. No início e no final do ensaio, determinam-se a dureza e o teor de amoníaco nos grupos de controlo, bem como num dos recipientes de ensaio e numa placa de cristalização correspondentes à concentração mais elevada.

DADOS E RELATÓRIOS

Tratamento dos resultados

42. Este ensaio de ciclo de vida visa determinar o efeito do produto químico em estudo na reprodução e, em duas gerações, na taxa de desenvolvimento e no número de insetos machos e fêmeas totalmente emergidos e vivos. Para a determinação da taxa de emergência, agregam-se os dados correspondentes a machos e fêmeas. Caso não haja diferenças de sensibilidade com significância estatística entre os dois sexos ao nível de taxa de desenvolvimento, os resultados correspondentes a machos e fêmeas podem ser agregados para análise estatística.

43. Em geral, calculam-se as concentrações com efeitos, expressas em concentração na água sobrenadante (protocolo da água enriquecida) ou nos sedimentos (protocolo dos sedimentos enriquecidos), com base nas concentrações medidas no início da exposição (ver o ponto 38). Portanto, no caso do protocolo da água enriquecida, determina-se a média correspondente a cada concentração de exposição das concentrações normalmente medidas no início da exposição na água sobrenadante dos recipientes de ambas as gerações e das placas de cristalização. No caso do protocolo dos sedimentos enriquecidos, determina-se a média correspondente a cada concentração de exposição das concentrações normalmente medidas no início da exposição nos recipientes de ambas as gerações (e, facultativamente, nas placas de cristalização).

44. Para efetuar uma estimativa pontual, ou seja, para determinar uma CE_x, os dados estatísticos por recipiente e por gaiola de criação podem equiparar-se a replicados reais. No cálculo de um intervalo de confiança para qualquer valor CE_x, é necessário ter em conta a variabilidade entre recipientes, ou deve demonstrar-se que essa variabilidade é tão reduzida que pode ser ignorada. Se o modelo for ajustado pelo método dos mínimos quadrados, deve aplicar-se uma transformação aos dados estatísticos por recipiente, para melhorar a homogeneidade da variância. Contudo, os valores de CE_x só devem ser calculados após retransformação da resposta no valor original (31).

▼M6

45. Se a análise estatística tiver por objetivo determinar a NOEC recorrendo a testes de hipóteses, é necessário ter em conta a variabilidade entre recipientes, o que fica garantido pelo recurso a métodos de análise de variância (por exemplo os testes de Williams e de Dunnett). O teste de Williams é adequado quando, teoricamente, é de esperar uma relação dose-resposta monótona; caso contrário, é adequado um teste de Dunnett. Se não se verificarem os pressupostos habituais da análise de variância, testes mais robustos (27) podem constituir uma alternativa adequada (31).

Taxa de emergência

46. Os dados relativos às taxas de emergência são dados quantais, que podem ser analisados através de um teste de Cochran-Armitage aplicado de forma regressiva, nos casos em que se prevê uma relação dose-resposta monótona e os dados são compatíveis com a previsão. Caso contrário, pode recorrer-se a um teste exato de Fisher ou a um teste de Mantel-Haentzal com valores p ajustados segundo o método de Bonferroni-Holm. Se, para a mesma concentração, houver indícios de uma maior variabilidade entre replicados do que a sugerida por uma distribuição binomial (frequentemente referida como variação «extrabinomial»), deve utilizar-se um teste exato de Fisher ou um teste de Cochran-Armitage robusto, como proposto na referência (27).

Determina-se a soma dos insetos (machos e fêmeas) vivos emergidos por recipiente, n_e, e divide-se esse número pelo número de larvas introduzidas, n_a:

$$TE = \frac{n_e}{n_a}$$

em que:

TE = taxa de emergência,

n_e = número de insetos vivos emergidos no recipiente,

n_a = número de larvas introduzidas no recipiente (normalmente 20).

Quando n_e é superior a n_a (ou seja, quando foi introduzido involuntariamente um número de larvas maior do que o previsto), considera-se n_a igual a n_e.

47. Uma alternativa mais adequada a amostras grandes, quando se regista variância extrabinomial, consiste em tratar a taxa de emergência como uma resposta contínua e aplicar métodos compatíveis com os dados de taxa de emergência em causa. Neste contexto, uma amostra «grande» é definida como aquela em que o número total de insetos emergidos e não emergidos é, cada um deles, superior a cinco por replicado (recipiente).

48. A aplicação de métodos de análise de variância implica a aplicação prévia aos valores de taxa de emergência de uma transformada de arco-seno da raiz quadrada ou de uma transformada de Tukey-Freeman, de forma a obter uma distribuição aproximadamente normal e uniformizar as variâncias. Quando se utilizam as frequências absolutas, podem ser aplicados os testes de Cochran-Armitage, exato de Fisher (com ajustamento de Bonferroni) e de Mantel-Haentzal. A transformação arco-seno da raiz quadrada consiste em calcular o inverso do seno ($\sin^{-1}$) da raiz quadrada do valor da taxa de emergência.

49. No respeitante às taxas de emergência, calculam-se os valores CE_x por análise de regressão — por exemplo por recurso aos modelos *probit*, *logit* ou Weibull (28). Se a análise de regressão não resultar (por exemplo se o número de respostas parciais for inferior a dois), utilizam-se outros métodos não-paramétricos, como a média móvel ou interpolação simples.

Taxa de desenvolvimento

50. O tempo de desenvolvimento médio representa o tempo médio decorrido entre a introdução das larvas (dia 0 do ensaio) e a emergência dos insetos correspondentes (para o cálculo do tempo de desenvolvimento real, é

▼M6

necessário ter em conta a idade das larvas no momento da introdução). A taxa de desenvolvimento é o inverso do tempo de desenvolvimento (unidade: 1/dia) e representa a quantidade de desenvolvimento larvar que ocorre por dia. A taxa de desenvolvimento é o parâmetro preferido para a avaliação destes estudos de toxicidade de sedimentos, dado que a sua variância é mais baixa que a do tempo de desenvolvimento, sendo também mais homogénea e mais próxima da distribuição normal. Os testes paramétricos mais potentes adaptam-se, portanto, à taxa de desenvolvimento, mas não ao tempo de desenvolvimento. Tratando a taxa de desenvolvimento como uma resposta contínua, os valores de CE_x podem ser estimados por recurso a uma análise de regressão — por exemplo como descrito em (29)(30). Os métodos de análise de variância (por exemplo o teste de Williams ou o teste de Dunnett) permitem determinar uma NOEC correspondente à taxa de desenvolvimento média. Dado que os insetos machos emergem antes das fêmeas, isto é, têm uma taxa de desenvolvimento maior, é conveniente calcular uma taxa de desenvolvimento para cada sexo, além da correspondente a todos os insetos.

51. Para efeitos dos testes estatísticos, considera-se que o número de insetos observados no dia de inspeção x emergiu no ponto médio do intervalo de tempo compreendido entre o dia x e o dia x–d (d = duração do intervalo de inspeção, em geral 1 dia). A taxa de desenvolvimento média por recipiente ($\overline{x}$) é calculada com base na seguinte equação:

$$\overline{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i X_i}{n_e}$$

em que:

$\overline{x}$: taxa de desenvolvimento média por recipiente,

i: índice do intervalo de inspeção,

m: número máximo de intervalos de inspeção,

f_i: número de insetos emergidos no intervalo de inspeção i,

n_e: número de insetos emergidos no final do ensaio (),

x_i: taxa de desenvolvimento dos insetos emergidos no intervalo i,

$$x_i = 1/\text{em que} :_i - \frac{d_i}{2}$$

dia

dia_i: dia de inspeção (dias decorridos desde a introdução das larvas),

d_i: duração do intervalo de inspeção i (número de dias, normalmente 1 dia).

Rácio sexual

52. Os rácios sexuais são dados quantais, pelo que devem ser avaliados por recurso ao teste exato de Fisher ou a outro método adequado. O rácio sexual natural da *Chironomus riparius* tem o valor um, o que significa que a abundância dos machos é igual à das fêmeas. O tratamento dos dados de rácio sexual deve ser o mesmo para as duas gerações. Uma vez que o número máximo de insetos por recipiente (ou seja, 20) é demasiado pequeno para possibilitar análises com significância estatística, determina-se o número total de insetos de cada sexo totalmente emergidos e vivos

▼M6

em todos os recipientes correspondentes à mesma concentração. Comparam-se numa tabela de contingência 2 × 2 esses dados não-transformados com os dados correspondentes ao grupo de controlo (do solvente) ou com os dados de controlo agregados.

Reprodução

53. Calcula-se a reprodução, expressa em fecundidade, como o número de aglomerados de ovos por fêmea. Mais concretamente, divide-se o número de aglomerados de ovos produzidos numa gaiola de criação pelo número de fêmeas vivas não-lesionadas nela introduzidas. Os métodos de análise de variância (por exemplo o teste de Williams ou o teste de Dunnett) permitem determinar uma NOEC correspondente à fecundidade.

54. A fertilidade dos aglomerados de ovos serve para quantificar o número de aglomerados de ovos férteis por fêmea. Divide-se o número de aglomerados de ovos férteis produzidos numa gaiola de criação pelo número de fêmeas vivas não-lesionadas nela introduzidas. Os métodos de análise de variância (por exemplo o teste de Williams ou o teste de Dunnett) permitem determinar uma NOEC correspondente à fertilidade.

Relatório do ensaio

55. Elementos a constar do relatório do ensaio:

Produto químico em estudo

— estado físico e propriedades físico-químicas (hidrossolubilidade, pressão de vapor, log K_{ow}, coeficiente de partição no solo — ou nos sedimentos, se disponível –, estabilidade na água e nos sedimentos etc.);

— dados de identificação química (denominação comum, denominação química, fórmula estrutural, número CAS etc.), incluindo o grau de pureza e o método analítico de determinação quantitativa do produto químico.

Espécie utilizada no ensaio

— organismos utilizados no ensaio: espécie, nome científico, origem e condições de criação;

— informações sobre o modo de manipulação dos aglomerados de ovos e das larvas;

— informações sobre a manipulação dos adultos emergidos da 1.ª geração com um exaustor etc. (ver o apêndice 5);

— idade dos organismos ao serem introduzidos nos recipientes de ensaio da 1.ª e 2.ª gerações.

Condições de realização do ensaio

— sedimentos utilizados — de origem natural ou formulados (artificiais);

— sedimentos naturais: localização e descrição do local de colheita dos sedimentos, incluindo, se possível, o historial de contaminação; características dos sedimentos: pH, teor de carbono orgânico, razão C/N e granulometria (se pertinente);

— sedimentos formulados: preparação, ingredientes e características (teor de carbono orgânico, pH, humidade etc. medidos no início do ensaio);

— preparação da água para os ensaios, caso seja utilizada água reconstituída, e características da mesma (concentração de oxigénio, pH, dureza etc. medidos no início do ensaio);

▼M6

— espessura dos sedimentos e da camada de água sobrenadante nos recipientes de ensaio e nas placas de cristalização;

— volume da água sobrenadante e da água dos poros; peso dos sedimentos húmidos (com e sem a água dos poros) dos recipientes de ensaio e das placas de cristalização;

— recipientes de ensaio (material e dimensões);

— placas de cristalização (material e dimensões);

— gaiolas de criação (material e dimensões);

— método de preparação das soluções de reserva e concentrações ensaiadas nos recipientes de ensaio e nas placas de cristalização;

— aplicação do produto químico em estudo nos recipientes de ensaio e nas placas de cristalização: concentrações ensaiadas, número de replicados e (se necessários) solventes;

— condições de incubação nos recipientes de ensaio: temperatura, ciclo de iluminação e intensidade luminosa, arejamento (bolhas por segundo);

— condições de incubação nas gaiolas de criação e nas placas de cristalização: temperatura, ciclo de iluminação e intensidade luminosa;

— condições de incubação dos aglomerados de ovos nas placas de microtitulação (ou noutros recipientes): temperatura, ciclo de iluminação e intensidade luminosa;

— informações pormenorizadas sobre a alimentação dos organismos, incluindo o tipo de alimentos, a preparação destes e a quantidade e frequência da alimentação.

Resultados

— concentrações de ensaio nominais, concentrações de ensaio medidas e resultados de todas as análises efetuadas para determinar a concentração do produto químico em estudo nos recipientes de ensaio e nas placas de cristalização;

— qualidade da água nos recipientes de ensaio e nas placas de cristalização (pH, temperatura, oxigénio dissolvido, dureza e amoníaco);

— água evaporada no ensaio eventualmente reposta nos recipientes de ensaio;

— número de insetos machos e fêmeas emergidos diariamente por recipiente (1.ª e 2.ª gerações separadamente);

— rácio sexual de insetos totalmente emergidos e vivos por nível de exposição (1.ª e 2.ª gerações separadamente);

— número de larvas, por recipiente, que não emergiram como insetos adultos (1.ª e 2.ª gerações separadamente);

— percentagem/fração de emergência por replicado e por concentração ensaiada (insetos machos e fêmeas agregados) (1.ª e 2.ª gerações separadamente);

— taxa de desenvolvimento média dos insetos totalmente emergidos e vivos por replicado e por concentração ensaiada (insetos machos e fêmeas separados e também agregados) (1.ª e 2.ª gerações separadamente);

— número de aglomerados de ovos depositados diariamente nas placas de cristalização, por gaiola de criação;

▼**M6**

— características dos aglomerados de ovos (dimensão, forma e fertilidade de cada um);

— fecundidade — número de aglomerados de ovos dividido pelo número de fêmeas introduzidas na gaiola de criação;

— fertilidade — número de aglomerados de ovos férteis dividido pelo número de fêmeas introduzidas na gaiola de criação;

— estimativas de parâmetros de toxicidade, por exemplo CE_x (e os intervalos de confiança associados) e NOEC, e métodos estatísticos utilizados para a determinação dos mesmos;

— discussão dos resultados, incluindo qualquer influência nos resultados do ensaio decorrente de alterações efetuadas ao método de ensaio.

REFERÊNCIAS

1) Capítulo C.28 deste anexo: Ensaio de toxicidade em quironomídeos num sistema sedimentos-água com água enriquecida.

2) Shobanov, N.A., Kiknadze, I.I., Butler, M.G. (1999). Palearctic and Nearctic *Chironomus* (*Camptochironomus*) *tentans* Fabricius are different species (Diptera: Chironomidae). *Entomologica Scandinavica*, 30:311--322.

3) Fleming, R. *et al.* (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Final Report to the European Commission. Relatório n.º EC 3738. Agosto de 1994. WRc, Reino Unido.

4) SETAC (1993). Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. Do *workshop* WOSTA realizado nos Países Baixos.

5) ASTM International (2009). E1706-05E01: Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates., *In* Annual Book of ASTM Standards, volume 11.06, Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology. ASTM International. West Conshohocken, PA.

6) Environment Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method, Report SPE 1/RM/32, dezembro de 1997.

7) US EPA (2000). Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Segunda edição, EPA 600/R-99/064, março de 2000. Revisão da primeira edição, de junho de 1994.

8) US EPA/OPPTS 850.1735 (1996). Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.

9) US EPA/OPPTS 850.1790 (1996). Chironomid Sediment Toxicity Test.

10) Milani, D., Day, K.E., McLeay, D.J., Kirby, R.S. (1996). Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods (*Hyalella azteca*) and midge larvae (*Chironomus riparius*), Technical Report. Environment Canada, National Water Research Institute. Burlington, Ontário, Canadá.

11) Norberg-King, T.J., Sibley, P.K., Burton, G.A., Ingersoll, C.G., Kemble, N.E., Ireland, S., Mount, D.R., Rowland, C.D. (2006). Interlaboratory evaluation of *Hyalella azteca* and *Chironomus tentans* short-term and long-term sediment toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.*, 25:2662-2674.

▼**M6**

12) Taenzler, V., Bruns, E., Dorgerloh, M., Pfeifle, V., Weltje, L. (2007). Chironomids: suitable test organisms for risk assessment investigations on the potential endocrine-disrupting properties of pesticides. *Ecotoxicology*, 16:221-230.

13) Sugaya, Y. (1997). Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides in *Chironomus yoshimatsui*. *Jp. J. Sanit. Zool.*, 48:345-350.

14) Kawai, K. (1986). Fundamental studies on chironomid allergy. I. Culture methods of some Japanese chironomids (Chironomidae, Diptera). *Jp. J. Sanit. Zool.*, 37:47-57.

15) Capítulo C.27 deste anexo: Ensaio de toxicidade em quironomídeos num sistema sedimentos-água com sedimentos enriquecidos.

16) OCDE (2000). *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*. Environment, Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, No. 23, ENV/JM/MONO(2000)6. OCDE, Paris.

17) Weltje, L., Rufli, H., Heimbach, F., Wheeler, J., Vervliet-Scheebaum, M., Hamer, M. (2010). The chironomid acute toxicity test: development of a new test system. *Integr. Environ. Assess. Management*.

18) Environment Canada (1995). Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant. Relatório EPS 1/RM/30, setembro de 1995.

19) Oetken, M., Nentwig, G., Löffler, D., Ternes, T., Oehlmann, J. (2005). Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates. Part I, The antiepileptic drug carbamazepine. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 49:353-361.

20) Suedel, B.C., Rodgers, J.H. (1994). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. *Environ. Toxicol. Chem.*, 13:1163-1175.

21) Naylor, C., Rodrigues, C. (1995). Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment. *Chemosphere*, 31:3291-3303.

22) Dunnett, C.W. (1964). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statis. Assoc.*, 50:1096-1121.

23) Dunnett, C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics*, 20:482-491.

24) Williams, D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics*, 27:103-117.

25) Williams, D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics*, 28:510-531.

26) Jungmann, D., Bandow, C., Gildemeister, T., Nagel, R., Preuss, T.G., Ratte, H.T., Shinn, C., Weltje, L., Maes, H.M. (2009). Chronic toxicity of fenoxycarb to the midge *Chironomus riparius* after exposure in sediments of different composition. *J. Soils Sediments*, 9:94-102.

27) Rao, J.N.K., Scott, A.J. (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. *Biometrics*, 48:577-585.

28) Christensen, E.R. (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. *Water Res.*, 18:213-221.

▼**M6**

29) Bruce, R.D., Versteeg, D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environ. Toxicol. Chem.*, 11:1485-1494.

30) Slob, W. (2002). Dose-response modelling of continuous endpoints. *Toxicol. Sci.*, 66:298-312.

31) OCDE (2006). *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to application*. OECD Series on Testing and Assessment, No. 54, 146 pp., ENV/JM/MONO(2006)18. OCDE, Paris.

32) Benoit, D.A., Sibley, P.K., Juenemann, J.L., Ankley, G.T. (1997). *Chironomus tentans* life-cycle test: design and evaluation for use in assessing toxicity of contaminated sediments. *Environ. Toxicol. Chem.*, 16:1165--1176.

33) Vogt, C., Belz, D., Galluba, S., Nowak, C., Oetken, M., Oehlmann, J. (2007). Effects of cadmium and tributyltin on development and reproduction of the non-biting midge *Chironomus riparius* (Diptera) — baseline experiments for future multi-generation studies. *J. Environ. Sci. Health*, Parte A, 42:1-9.

34) OCDE (2010). *Validation report of the Chironomid full life-cycle toxicity test*. A publicar na «Series on Testing and Assessment». OCDE, Paris.

▼**M6**

Apêndice 1

Definições

Aplicam-se neste método de ensaio as seguintes definições:

Produto químico: substância ou mistura.

Sedimentos formulados ou reconstituídos ou artificiais ou sintéticos: mistura de matérias utilizadas para simular os componentes de sedimentos naturais.

Água sobrenadante: água à superfície dos sedimentos, no recipiente de ensaio.

Água intersticial ou água dos poros: água que ocupa o espaço entre as partículas de sedimentos e de solo.

Água enriquecida: água utilizada no ensaio, à qual foi adicionado o produto químico em estudo.

Produto químico em estudo: qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado este método de ensaio.

▼M6

Apêndice 2

Recomendações para a cultura de *Chironomus riparius*

1. As larvas de *Chironomus* podem ser criadas em placas de cristalização ou em recipientes de maiores dimensões. Espalha-se no fundo do recipiente areia quartzítica fina de modo a constituir uma camada fina com 5 mm a 10 mm de espessura. Verificou-se que o *kieselguhr* (por exemplo o artigo Merck 8117) é também um substrato adequado; neste caso, pode utilizar-se uma camada mais fina, da ordem de poucos milímetros. Adiciona-se em seguida uma camada de vários centímetros de uma água adequada. Se necessário, os níveis de água podem ser repostos para compensar a evaporação e evitar a dessecação. Se necessário, a água pode ser substituída. Deve efetuar-se um arejamento ligeiro. Os recipientes de criação das larvas devem ser mantidos em gaiolas adequadas, de forma a evitar fugas de adultos emergentes. A gaiola deve ser suficientemente grande (no mínimo cerca de 30 cm × 30 cm × 30 cm) para permitir a enxameação dos adultos emergidos, sem o que poderá não ocorrer copulação.

2. As gaiolas devem ser mantidas à temperatura ambiente ou a uma temperatura constante de 20 °C ± 2 °C, com um período de luminosidade (cerca de 1 000 lux de intensidade) de 16 horas seguido de oito horas de escuridão. Existem indicações de que uma humidade relativa do ar inferior a 60 % pode impedir a reprodução.

Água de diluição

3. Pode utilizar-se qualquer água natural ou sintética adequada. Utiliza-se, em geral, água de poços, água da torneira desclorada ou meios artificiais (por exemplo meio M4 de Elendt ou meio M7; ver adiante). A água tem de ser arejada antes da utilização. Se necessário, a água das culturas pode ser renovada por vazamento ou sifonagem cuidadosos da água usada dos recipientes de cultura sem destruir os tubos das larvas.

Alimentação das larvas

4. As larvas de *Chironomus* são alimentadas com cerca de 250 mg por recipiente e por dia de um alimento floculado para peixes (Tetra Min®, Tetra Phyll® ou outra marca registada semelhante). Os alimentos podem ser fornecidos na forma de um pó seco obtido por moagem ou de uma suspensão em água (adiciona-se 1,0 g de alimento floculado a 20 ml de água de diluição e mistura-se, de modo a obter uma mistura homogénea). A suspensão pode ser fornecida à razão aproximada de 5 ml diários por recipiente (agitar antes de utilizar). As larvas com mais idade podem receber mais alimento.

5. Ajusta-se a alimentação em função da qualidade da água. Se o meio de cultura se tornar turvo, deve reduzir-se a alimentação. O fornecimento de alimentos deve ser cuidadosamente vigiado. A escassez de alimentos causaria a migração das larvas para a coluna de água, enquanto uma alimentação demasiado rica aumentaria a atividade microbiana e reduziria a concentração de oxigénio. Ambas as situações podem resultar na redução das taxas de crescimento.

6. Ao preparar novos recipientes de cultura, podem também ser adicionadas algumas células de algas verdes (por exemplo *Scenedesmus subspicatus* ou *Chlorella vulgaris*).

Alimentação dos adultos emergidos

7. Alguns experimentadores sugeriram que um tampão de algodão embebido numa solução saturada de sacarose pode servir de alimento para os adultos emergidos.

▼M6

Emergência

8. À temperatura de 20 °C ± 2 °C, os adultos começam a emergir dos recipientes de criação das larvas decorridos 13 a 15 dias. Distinguem-se facilmente os machos pelas suas antenas plumosas e pelo seu corpo fino.

Aglomerados de ovos

9. A partir do momento em que estejam presentes adultos nas gaiolas de criação, deve verificar-se três vezes por semana se ocorre a deposição de aglomerados gelatinosos de ovos nos recipientes de criação das larvas. Se tal suceder, esses aglomerados devem ser transferidos com cuidado para uma pequena cápsula que já contenha um pouco de água de criação. Utilizam-se os aglomerados de ovos para iniciar novas culturas noutros recipientes (por exemplo 2 a 4 aglomerados de ovos por recipiente) ou em ensaios de toxicidade.

10. Decorridos 2 a 3 dias, devem eclodir larvas no primeiro estádio larvar.

Preparação de novos recipientes de cultura

11. Uma vez estabelecidas as culturas, deve ser possível preparar um novo recipiente de cultura de larvas por semana, ou menos frequentemente (consoante as necessidades do ensaio), removendo-se os recipientes mais antigos após a emergência dos insetos adultos. O recurso a este sistema permite um aprovisionamento regular de insetos adultos com uma gestão mínima.

Preparação das soluções de ensaio M4 e M7

12. O meio M4 foi descrito por Elendt (1990). Prepara-se o meio M7 do mesmo modo que o M4, exceto no que respeita às substâncias indicadas no quadro 1, cujas concentrações são quatro vezes inferiores às do meio M4. A solução de ensaio não deve ser preparada segundo Elendt e Bias (1990), pois as concentrações de $NaSiO_3 \times 5H_2O$, $NaNO_3$, KH_2PO_4 e K_2HPO_4 indicadas para a preparação das soluções de reserva não são adequadas.

Preparação do meio M7

13. Prepara-se cada solução de reserva (I) separadamente e, em seguida, a partir destas, uma solução de reserva combinada (II) (ver o quadro 1). Prepara-se o meio M7 diluindo para 1 litro, com água desionizada, 50 ml da solução de reserva combinada (II) e as quantidades de cada solução de reserva de macronutrientes indicadas no quadro 2. Prepara-se uma solução de reserva de vitaminas juntando três vitaminas a água desionizada como indicado no quadro 3; adiciona-se 0,1 ml da solução de reserva combinada de vitaminas ao meio M7 final pouco antes da utilização (a solução de reserva de vitaminas é conservada congelada, em pequenas alíquotas). Areja-se e estabiliza-se o meio.

Quadro 1

Soluções de reserva de elementos vestigiais para os meios M4 e M7.

Soluções de reserva (I)	Quantidade (mg) diluída para 1 litro com água desionizada	Para preparar a solução de reserva combinada (II), misturam-se as seguintes quantidades (ml) de soluções de reserva (I) e diluiu-se para 1 litro com água desionizada		Concentrações finais nas soluções de ensaio (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3 (1)	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$MnCl_2 \times 4H_2O$ (1)	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl (1)	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077

▼**M6**

Soluções de reserva (I)	Quantidade (mg) diluída para 1 litro com água desionizada	Para preparar a solução de reserva combinada (II), misturam-se as seguintes quantidades (ml) de soluções de reserva (I) e diluiu-se para 1 litro com água desionizada		Concentrações finais nas soluções de ensaio (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
RbCl (1)	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$SrCl_2 \times 6H_2O$ (1)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (1)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$Na_2MoO_4 \times 2H_2O$ (1)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$CuCl_2 \times 2H_2O$ (1)	335	1,0	0,25	0,017	0,004
$ZnCl_2$	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$CaCl_2 \times 6H_2O$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na_2SeO_3	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
$Na_2EDTA \times 2H_2O$ (1) (2)	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
$FeSO_4 \times 7H_2O$ (1) (2)	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) As quantidades destas substâncias são diferentes nos meios M4 e M7, como se indica no quadro.
(2) Preparam-se estas soluções separadamente, misturam-se e colocam-se de imediato numa autoclave.

Quadro 2

Soluções de reserva de macronutrientes para os meios M4 e M7.

	Quantidade diluída para 1 litro com água desionizada (mg)	Quantidade de cada solução de reserva de macronutrientes adicionada para preparar os meios M4 e M7 (ml/l)	Concentrações finais nas soluções de ensaio M4 e M7 (mg/l)
$CaCl_2 \times 2H_2O$	293 800	1,0	293,8
$MgSO_4 \times 7H_2O$	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
$NaHCO_3$	64 800	1,0	64,8
$NaSiO_3 \times 9H_2O$	50 000	0,2	10,0
$NaNO_3$	2 740	0,1	0,274
KH_2PO_4	1 430	0,1	0,143
K_2HPO_4	1 840	0,1	0,184

▼**M6**

Quadro 3

Soluções de reserva de vitaminas para os meios M4 e M7.

Combinam-se as três soluções de vitaminas numa única solução de reserva de vitaminas.

	Quantidade diluída para 1 litro com água desionizada (mg)	Quantidade de cada solução de reserva de vitaminas adicionada para preparar os meios M4 e M7 (ml/l)	Concentrações finais nas soluções de ensaio M4 e M7 (mg/l)
Cloridrato de tiamina	750	0,1	0,075
Cianocobalamina (B12)	10	0,1	0,0010
Biotina	7,5	0,1	0,00075

REFERÊNCIAS

BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Editado por M. Streloke e H. Köpp, Berlim.

Elendt, B.P. (1990). Selenium deficiency in Crustacea. *Protoplasma*, 154:25-33.

Elendt, B.P., Bias, W.-R. (1990).Trace nutrient deficiency in *Daphnia magna* cultured in standard medium for toxicity testing, Effects on the optimisation of culture conditions on life history parameters of *D. magna*. *Water Research*, 24:1157-1167.

▼M6

Apêndice 3

Preparação de sedimentos formulados

COMPOSIÇÃO DOS SEDIMENTOS

Composição dos sedimentos formulados:

Componente	Características	Percentagem do peso seco dos sedimentos
Turfa	Turfa de *Sphagnum*, com pH tão próximo quanto possível do intervalo 5,5-6,0, sem restos visíveis de plantas, finamente moída (granulometria ≤ 1 mm) e seca ao ar	4 - 5
Areia quartzítica	Granulometria: > 50 % das partículas de granulometria na gama 50-200 μm	75 - 76
Argila caulínica	Teor de caulinite ≥ 30 %	20
Carbono orgânico	Ajustado por adição de turfa e areia	2 (± 0,5)
Carbonato de cálcio	$CaCO_3$ pulverizado quimicamente puro	0,05 - 0,1
Água	Condutividade ≤ 10 μS/cm	30 - 50

PREPARAÇÃO

Seca-se a turfa ao ar e mói-se até se obter um pó fino. Prepara-se uma suspensão da quantidade necessária de turfa pulverizada em água desionizada, por recurso a um dispositivo de homogeneização de alta eficiência. Ajusta-se o pH desta suspensão a 5,5 ± 0,5 com $CaCO_3$. Condiciona-se a suspensão durante, pelo menos, dois dias, com agitação ligeira a 20 °C ± 2 °C, para estabilizar o pH e estabelecer um perfil microbiano estável. Findo este período, determina-se novamente o pH, que deve ser de 6,0 ± 0,5. Mistura-se então a suspensão de turfa com os outros componentes (areia e argila caulínica) e água desionizada, de forma a obter sedimentos homogéneos com teor de água da ordem de 30–50 % do peso seco dos sedimentos. Determina-se uma vez mais o pH da mistura final e, se necessário, ajusta-se a 6,5-7,5 com $CaCO_3$. Colhem-se amostras dos sedimentos para determinar o peso seco e o teor de carbono orgânico. Recomenda-se que, antes de serem utilizados em ensaios de toxicidade em quironomídeos, os sedimentos formulados sejam mantidos durante sete dias em condições idênticas às do ensaio subsequente.

CONSERVAÇÃO

Os componentes secos para a preparação de sedimentos artificiais podem ser conservados à temperatura ambiente num local seco e fresco. Os sedimentos formulados (húmidos) não devem ser armazenados antes de serem utilizados nos ensaios. Devem ser utilizados imediatamente após o período de condicionamento de sete dias que conclui a sua preparação.

REFERÊNCIAS

OCDE (1984). *Earthworm, Acute Toxicity Test*. Test Guideline No. 207. Guidelines for the Testing of Chemicals. OCDE, Paris.

Meller, M., Egeler, P., Roembke, J., Schallnass, H., Nagel, R., Streit, B. (1998). Short-term toxicity of lindane, hexachlorobenzene and copper sulfate on tubificid sludgeworms (Oligochaeta) in artificial media. *Ecotox. Environ. Safety*, 39:10-20.

▼**M6**

Apêndice 4

Características químicas de uma água de diluição adequada

COMPONENTE	CONCENTRAÇÃO
Partículas	< 20 mg/l
Carbono orgânico total	< 2 mg/l
Amoníaco não–ionizado	< 1 µg/l
Dureza, expressa em $CaCO_3$	< 400 mg/l (*)
Cloro residual	< 10 µg/l
Pesticidas organofosforados totais	< 50 ng/l
Soma dos pesticidas organoclorados e dos bifenilos policlorados, totais	< 50 ng/l
Cloro orgânico total	< 25 ng/l

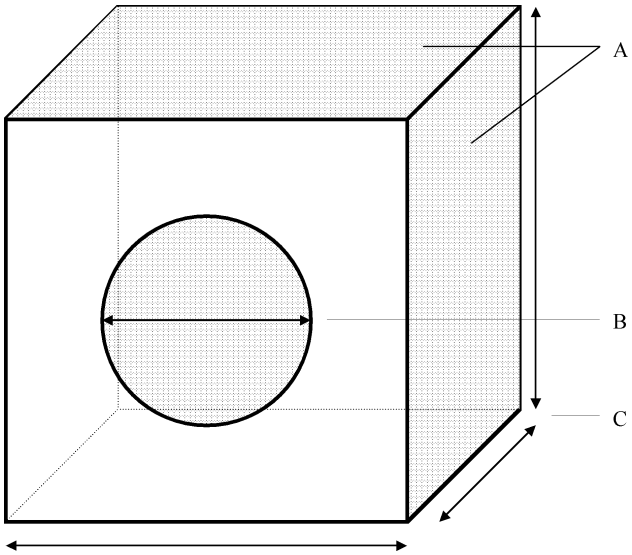
(*) No entanto, caso se suspeite de uma interação entre os iões responsáveis pela dureza e o produto químico em estudo, deve utilizar-se uma água mais macia (nessa eventualidade, não pode utilizar-se o meio M4 descrito por Elendt).

▼**M6**

Apêndice 5

Orientações para a realização do ensaio

Exemplo de gaiola de criação:



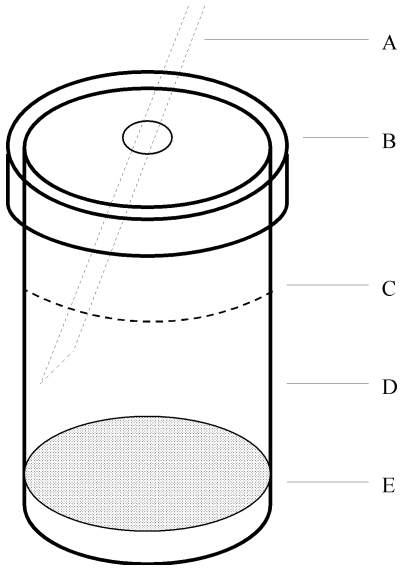
A: tela na face superior e, pelo menos, num dos lados da gaiola (malha de aproximadamente 1 mm);

B: abertura para introdução, na gaiola de criação, dos adultos emergidos e para remoção dos aglomerados de ovos das placas de cristalização (não representadas na figura);

C: dimensões mínimas da gaiola de criação: 30 cm de comprimento, 30 cm de altura e 30 cm de largura.

▼**M6**

Exemplo de recipiente de ensaio:



A: pipeta de Pasteur para arejamento da água sobrenadante;

B: tampa de vidro para evitar fugas de insetos emergidos;

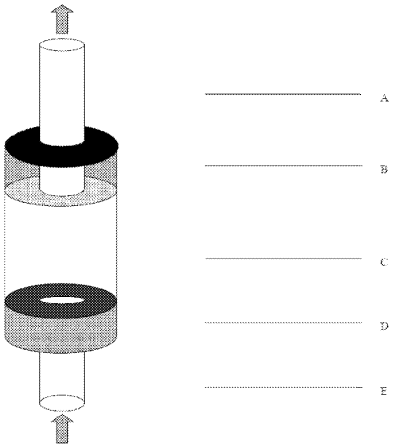
C: superfície da água;

D: recipiente de ensaio (copo de vidro com, pelo menos, 600 ml de capacidade);

E: camada de sedimentos.

▼**M6**

Exemplo de exaustor de captura de insetos adultos (as setas indicam o sentido do fluxo de ar):



A: tubo de vidro (diâmetro interno de aproximadamente 5 mm) ligado a uma bomba autoferrante;

B: rolha de borracha vulcanizada, atravessada pelo tubo A; para não lesionar os insetos sugados para o exaustor, a abertura interior do tubo de vidro A está coberta com algodão e uma tela (malha de aproximadamente 1 mm);

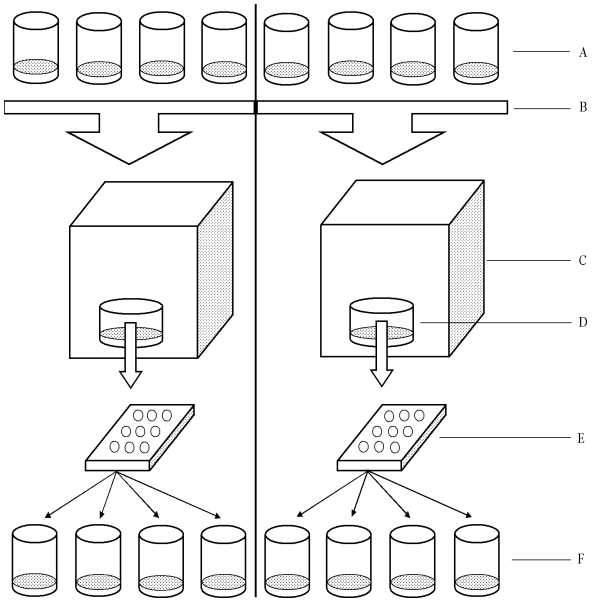
C: recipiente transparente (de plástico ou de vidro, com cerca de 15 cm de altura) para os insetos capturados;

D: rolha de borracha vulcanizada, atravessada pelo tubo E; para transferir os insetos para a gaiola de criação, retira-se a rolha D do recipiente C;

E: tubo (de plástico ou de vidro, com diâmetro interno de aproximadamente 8 mm) para recolha de insetos adultos dos recipientes.

▼**M6**

Representação esquemática de um ensaio de ciclo de vida:



A: 1.ª geração — recipientes de ensaio com um sistema sedimentos-água; oito replicados; 20 larvas no primeiro estádio larvar por recipiente;

B: associação de quatro recipientes de ensaio a cada gaiola de criação (A e B);

C: gaiolas de criação A e B, para enxameação, acasalamento e postura de ovos;

D: placas de cristalização para deposição dos aglomerados de ovos;

E: placas de microtitulação; um aglomerado de ovos por alvéolo;

F: 2.ª geração — recipientes de ensaio com um sistema sedimentos-água; oito replicados; 20 larvas no primeiro estádio larvar por recipiente.

▼M6

C.41. ENSAIO DE DESENVOLVIMENTO SEXUAL EM PEIXES

INTRODUÇÃO

1. Este método é equivalente ao *Test Guideline* TG 234 (2011) da OCDE. Baseia-se numa decisão de 1998 com vista à elaboração de métodos de ensaio atualizados ou novos para despistagem e ensaio de potenciais desreguladores do sistema endócrino. O Ensaio de Desenvolvimento Sexual em Peixes foi considerado um método de ensaio prometedor com incidência numa fase da vida dos peixes sensível a produtos químicos estrogénicos e androgénicos. Este método de ensaio foi objeto de um exercício de validação interlaboratorial que decorreu de 2006 a 2010, tendo sido validado para o peixe-do-arroz-japonês (*Oryzias latipes*), o peixe-zebra (*Danio rerio*) e o esgana-gata (*Gasterosteus aculeatus*) e parcialmente validado para o vairão-de-cabeça-gorda (*Pimephales promelas*) (41)(42)(43). O presente protocolo aplica-se ao peixe-do-arroz-japonês, ao esgana-gata e ao peixe-zebra. Constitui, em princípio, um aperfeiçoamento do *Test Guideline* 210 da OCDE (1), um ensaio de toxicidade aplicável aos primeiros estádios da vida dos peixes, prosseguindo a exposição até à diferenciação sexual dos peixes — a qual ocorre cerca de 60 dias após a eclosão no caso do peixe-do-arroz-japonês, do esgana-gata e do peixe-zebra (o período de exposição poderá ser mais curto ou mais longo no caso de outras espécies que venham a ser validadas) — e tendo sido incluídos parâmetros de sensibilidade endócrina. O Ensaio de Desenvolvimento Sexual em Peixes avalia efeitos nos primeiros estádios de vida e possíveis consequências indesejadas de produtos químicos potencialmente desreguladores do sistema endócrino (por exemplo, estrogénios, androgénios e inibidores da esteroidogénese) no desenvolvimento sexual. A combinação dos dois parâmetros endócrinos principais — concentração de vitelogenina e rácio sexual fenotípico — possibilita que o ensaio revele o modo de ação do produto químico em estudo. Dado que as variações do rácio sexual fenotípico são características da população em causa, pode utilizar-se o Ensaio de Desenvolvimento Sexual em Peixes para avaliar perigos e riscos. Todavia, caso se pretenda recorrer a este ensaio para avaliar perigos e riscos, não deve utilizar-se o esgana-gata, pois os dados de validação atualmente disponíveis mostram que, no caso desta espécie, não são comuns alterações do rácio sexual fenotípico induzidas por produtos químicos.

2. O protocolo baseia-se na exposição de peixes a produtos químicos através da água durante o período sexual lábil, no decurso do qual os peixes são previsivelmente mais sensíveis aos efeitos dos produtos químicos desreguladores do sistema endócrino que interferem no desenvolvimento sexual. Medem-se dois parâmetros principais indicadores de aberrações de desenvolvimento de carácter endócrino: as concentrações de vitelogenina e os rácios sexuais (proporção de cada sexo) determinados por histologia das gónadas. A histopatologia das gónadas (avaliação e classificação do estádio de desenvolvimento dos ovócitos e das células espermatogénicas) é facultativa. Sempre que possível, também se determina o sexo genético (designadamente no peixe-do-arroz-japonês e no esgana-gata). A presença de um marcador do sexo genético constitui uma vantagem considerável, pois este aumenta o poder estatístico dos efeitos no rácio sexual e permite individualizar as inversões de sexo fenotípico. Outros parâmetros apicais a medir são a taxa de eclosão, a sobrevivência, o comprimento dos peixes e o peso corporal destes. Este método de ensaio poderá ser adaptado a espécies diferentes das mencionadas, desde que as espécies pretendidas sejam objeto de uma validação equivalente à efetuada para o peixe-do-arroz-japonês, o esgana-gata e o peixe-zebra, que os peixes de controlo se apresentem sexualmente diferenciados no final do ensaio, que os níveis de vitelogenina sejam suficientemente elevados para que possam detetar-se variações significativas devidas ao produto químico em estudo e que se determine a sensibilidade do sistema de ensaio utilizando determinados produtos químicos com atividade endócrina de referência — (anti)estrogénios, (anti)androgénios, inibidores da aromatase etc. Além disso, é necessário que a OCDE examine os relatórios de validação do Ensaio de Desenvolvimento Sexual em Peixes noutras espécies e que o resultado dessas validações seja considerado satisfatório.

▼M6

Considerações iniciais e limitações

3. As fêmeas de vertebrados ovíparos produzem normalmente vitelogenina como reação aos estrogénios endógenos em circulação (2). Trata-se se um precursor das proteínas do vitelo que, uma vez produzido no fígado, é transportado na corrente sanguínea até aos ovários, onde é absorvido e modificado pelos ovócitos em desenvolvimento. A síntese de vitelogenina é muito reduzida, embora seja detetável, nos peixes imaturos e nos peixes machos adultos, que não têm estrogénios suficientes em circulação. Porém, o fígado é capaz de sintetizar e segregar vitelogenina como reação a uma estimulação estrogénica exógena (3)(4)(5).

4. A medição da vitelogenina serve para detetar produtos químicos com modos de ação estrogénicos, antiestrogénicos ou androgénicos e produtos químicos (como os inibidores da aromatase) que interferem com a esteroidogénese. É possível detetar produtos químicos estrogénicos medindo a indução de vitelogenina em peixes machos, método documentado em numerosas publicações científicas pré-avaliadas por especialistas. Também se demonstrou a indução de vitelogenina após exposição a androgénios aromatizáveis (6)(7). A diminuição do nível de estrogénios em circulação nas fêmeas, por exemplo através da inibição da aromatase, que converte o androgénio endógeno no estrogénio natural 17β-estradiol, provoca uma diminuição da concentração de vitelogenina, efeito que é utilizado para detetar produtos químicos com propriedades inibidoras da aromatase ou, mais genericamente, inibidores da esteroidogénese (33). As consequências biológicas de uma inibição estrogénica/da aromatase no nível de vitelogenina são um facto assente e estão amplamente documentadas (8)(9). Todavia, a produção de vitelogenina nas fêmeas também pode ser afetada por toxicidade generalizada e por modos de ação tóxica não-endócrinos.

5. Foram desenvolvidos e normalizados com êxito vários métodos de medição para ensaios de rotina com vista à determinação quantitativa da vitelogenina em amostras de sangue, do fígado, do corpo inteiro e de homogeneizado da cabeça e da cauda, colhidas individualmente em peixes. No caso do peixe-zebra, do esgana-gata e do peixe-do-arroz-japonês, bem como da espécie parcialmente validada vairão-de-cabeça-gorda, existem métodos ELISA específicos para cada espécie que recorrem a processos imunoquímicos para quantificar a vitelogenina (5)(10)(11)(12)(13)(14)(15)(16). No peixe-do-arroz-japonês e no peixe-zebra, existe boa correlação entre a vitelogenina determinada em amostras de plasma sanguíneo, fígado e homogeneizado, embora os valores medidos no homogeneizado tendam a ser ligeiramente inferiores aos valores medidos no plasma (17)(18)(19). Descrevem-se no apêndice 5 os procedimentos recomendados para a colheita de amostras destinadas à análise da vitelogenina.

6. A variação do rácio sexual fenotípico (proporção de cada sexo) é um parâmetro indicador da inversão de sexo. Em princípio, os estrogénios, os antiestrogénios, os androgénios, os antiandrogénios e os produtos químicos inibidores da esteroidogénese podem afetar o rácio sexual dos peixes em desenvolvimento (20). Mostrou-se que esta inversão de sexo é parcialmente reversível no peixe-zebra (21) após exposição a produtos químicos de tipo estrogénico, ao passo que a inversão de sexo após exposição a produtos químicos de tipo androgénico é permanente (30). O sexo é determinado em cada peixe por exame histológico das gónadas e define-se como feminino, masculino, intersexual (ovócitos e células espermatogénicas presentes simultaneamente na mesma gónada) ou indiferenciado. O apêndice 7 e o documento de orientações da OCDE sobre o diagnóstico de histopatologias de tipo endócrino em gónadas de peixes (22) contêm orientações neste domínio.

7. Examina-se o sexo genético por meio dos marcadores genéticos eventualmente existentes na espécie de peixes em causa. No peixe-do-arroz-japonês, os genes femininos XX ou masculinos XY podem ser detetados por reação

▼M6

em cadeia da polimerase (PCR) e o gene do domínio DM ligado ao cromossoma Y (DMY) pode ser analisado (DMY negativo ou positivo) conforme se descreve nas referências (23)(24). Descreve-se no apêndice 10 um método PCR equivalente para a determinação do sexo genético no esgana-gata. O poder estatístico do ensaio sai reforçado quando é possível relacionar individualmente o sexo genético com o sexo fenotípico, pelo que deve determinar-se o sexo genético nas espécies que possuam marcadores documentados de sexo genético.

8. A combinação dos dois parâmetros endócrinos principais — concentração de vitelogenina e rácio sexual fenotípico — permite demonstrar o modo de ação endócrina (MAE) do produto químico em estudo (quadro 1). Dado que o rácio sexual é um biomarcador característico da população em causa (25)(26), no caso de alguns modos de ação bem definidos, os resultados obtidos pelo Ensaio de Desenvolvimento Sexual em Peixes podem ser utilizados para avaliar perigos e riscos, quando a autoridade reguladora o considerar adequado. Presentemente, esses modos de ação são os dos estrogénios, dos androgénios e dos inibidores da esteroidogénese.

Quadro 1

Reação dos parâmetros endócrinos a diversos modos de ação de produtos químicos:

↑= aumento, ↓= diminuição, — = não investigado.

Modo de ação	VTG ♂	VTG ♀	Rácio sexual	Referências
Agonista fraco dos estrogénios	↑	↑	↑♀ ou ↑indiferenciado	(27)(40)
Agonista forte dos estrogénios	↑	↑	↑♀ ou ↑indiferenciado, nulo♂	(28)(40)
Antagonista dos estrogénios	—	—	↓♀, ↑indiferenciado	(29)
Agonista dos androgénios	↓ ou —	↓ ou —	↑♂, nulo♀	(28)(30)
Antagonistas dos androgénios	—	—	↑♀, ↑intersexual	(31)
Inibidor da aromatase	↓	↓	↓♀	(33)

9. O Ensaio de Desenvolvimento Sexual em Peixes não abrange o estádio reprodutivo da vida dos peixes. Por esse motivo, os produtos químicos suspeitos de afetarem a reprodução a concentrações inferiores às que afetam o desenvolvimento sexual devem ser examinados num ensaio que abranja a reprodução.

10. No apêndice 1 definem-se alguns conceitos utilizados neste método.

11. O Ensaio de Desenvolvimento Sexual em Peixes visa detetar produtos químicos com propriedades androgénicas e estrogénicas, bem como com propriedades antiandrogénicas, antiestrogénicas e de inibição da esteroidogénese. As fases (1 e 2) de validação do Ensaio de Desenvolvimento Sexual em Peixes abrangeram produtos químicos estrogénicos, androgénicos e inibidores da esteroidogénese. O quadro 1 contempla os efeitos de antagonistas dos estrogénios e de antagonistas dos androgénios no Ensaio de Desenvolvimento Sexual em Peixes, mas estes modos de ação ainda estão pouco documentados.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

12. Neste ensaio, expõem-se os peixes, desde o ovo recentemente fecundado até ao termo da diferenciação sexual, a, pelo menos, três concentrações do produto químico em estudo dissolvido em água. O ensaio decorre em fluxo contínuo, a menos que não seja possível realizá-lo nessas condições por motivos ligados à disponibilidade ou à natureza (solubilidade reduzida, por exemplo) do produto químico em estudo. Inicia-se o ensaio com a

▼M6

colocação de ovos recentemente fertilizados (antes da segmentação do blastodisco) nas cubas de ensaio. A carga das cubas é descrita para cada espécie no ponto 27. Para as espécies de peixes validadas (peixe-do-arroz-japonês, esgana-gata e peixe-zebra), o ensaio termina 60 dias após a eclosão. Eutanasiam-se sem sofrimento os peixes no final do ensaio. Colhe-se uma amostra biológica (plasma sanguíneo, fígado ou homogeneizado da cabeça e da cauda) de cada peixe para a análise da vitelogenina, procedendo-se à fixação do restante para avaliação histológica das gónadas com vista à determinação do sexo fenotípico. A histopatologia (por exemplo classificação do estádio de desenvolvimento das gónadas, grau de intersexualidade) é facultativa. Nas espécies que possuem biomarcadores adequados, colhe-se uma amostra biológica (barbatana anal ou dorsal) para determinação do sexo genético (apêndices 9 e 10).

13. O apêndice 2 recapitula as condições experimentais relevantes para as espécies validadas (peixe-do-arroz-japonês, esgana-gata e peixe-zebra).

INFORMAÇÕES SOBRE O PRODUTO QUÍMICO EM ESTUDO

14. É necessário dispor de resultados de um ensaio de toxicidade aguda ou de outro ensaio de toxicidade a curto prazo [por exemplo o método de ensaio C.14 (34) e o *Test Guideline* 210 da OCDE (1)], de preferência realizado com a espécie escolhida para este ensaio. Isto implica que a hidrossolubilidade e a pressão de vapor do produto químico em estudo são conhecidas e que se dispõe de um método analítico fiável de determinação quantitativa daquele nas cubas de ensaio, sendo que a exatidão e o limite de deteção desse método são conhecidos e estão documentados.

15. A fórmula estrutural, o grau de pureza, a estabilidade em água e à luz, o pK_a, o P_{ow} e os resultados de um ensaio de biodegradabilidade «fácil» (método de ensaio C.4) do produto químico em estudo constituem outras informações úteis (35).

Critérios de aceitação do ensaio

16. Para que os resultados do ensaio possam considerar-se aceitáveis, têm de ser cumpridas as seguintes condições:

— concentração de oxigénio dissolvido ao longo do ensaio igual ou superior a 60 % do valor da saturação com ar (VSA);

— diferença de temperatura da água entre as diversas cubas de ensaio não superior a ±1,5 °C em qualquer momento do período de exposição, mantendo-se a temperatura da água de cada cuba sempre na gama de temperaturas especificada para a espécie utilizada no ensaio (apêndice 2);

— disponibilidade de um método validado de análise do produto químico ao qual a espécie utilizada no ensaio é exposta, com limite de deteção bastante abaixo da concentração nominal mais baixa, e existência de dados demonstrativos de que a concentração em solução do produto químico em estudo se manteve satisfatoriamente num intervalo de ±20 % relativamente à média dos valores medidos;

— taxa global de sobrevivência dos ovos fertilizados do grupo de controlo e, quando aplicável, do grupo de controlo do solvente igual ou superior aos limites definidos no apêndice 2;

— critérios de aceitação relativos ao crescimento e à proporção de cada sexo no termo do ensaio, baseados nos dados dos grupos de controlo (grupos de controlo do solvente e da água agregados, a menos que os resultados sejam significativamente diferentes, caso em que prevalecem os resultados do grupo do solvente):

▼M6

		Peixe-do-arroz--japonês	Peixe-zebra	Esgana-gata
Crescimento	Peso húmido de peixe (enxuto)	>150 mg	>75 mg	>120 mg
	Comprimento (padrão)	>20 mm	>14 mm	>20 mm
Rácio sexual (percentagem de machos ou fêmeas)		30-70 %	30-70 %	30-70 %

— solvente eventualmente utilizado sem efeitos com significância estatística na sobrevivência e sem nenhum efeito desregulador do sistema endócrino nem outros efeitos indesejados nos primeiros estádios de vida, comprovado por um grupo de controlo do solvente.

Caso se observe algum desvio dos critérios de aceitação do ensaio, ponderam-se as consequências na fiabilidade dos dados do ensaio e inclui-se essa análise no relatório.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

Cubas de ensaio

17. Podem ser utilizadas quaisquer cubas de vidro, de aço inoxidável ou de outro material quimicamente inerte. As dimensões das cubas devem ser suficientes para que possam ser cumpridos os requisitos relativos à taxa de carga adiante enunciados. É desejável que as cubas de ensaio sejam posicionadas de forma aleatória na área de ensaio. Porém, em vez de uma disposição completamente aleatória, é preferível uma organização por blocos e uma disposição aleatória em cada bloco, estando todas as concentrações presentes em cada bloco. As cubas de ensaio devem estar protegidas contra perturbações indesejadas.

Escolha da espécie

18. O apêndice 2 refere as espécies recomendadas. O processo de inclusão de novas espécies é descrito no ponto 2.

Manutenção dos peixes progenitores

19. O *Test Guideline* 210 da OCDE (1) descreve o modo de manutenção dos peixes progenitores em condições satisfatórias. Devem ser fornecidos aos peixes progenitores alimentos adequados uma ou duas vezes por dia.

Manipulação de embriões e de larvas

20. Inicialmente, os embriões e larvas podem ser expostos em cubas de vidro ou de aço inoxidável mais pequenas, dispostas no interior da cuba principal e cujos lados ou extremidades sejam constituídos por uma rede que possibilite o fluxo do produto químico em estudo através de cada cuba. Uma forma de criar um fluxo não-turbulento através dessas cubas mais pequenas consiste em pendurá-las num braço que as movimente para cima e para baixo, mas mantenha os organismos sempre submersos.

21. Quando se utilizam recipientes, grelhas ou malhas para confinar os ovos na cuba principal de ensaio, esses dispositivos de confinamento devem ser removidos após a eclosão das larvas, com exceção das malhas necessárias para evitar que os peixes escapem. Caso seja necessário transferir larvas, estas não devem ser expostas ao ar. Também não devem ser utilizadas redes para retirar peixes de recipientes de ovos. O momento adequado para efetuar esta transferência (que nem sempre é necessária) varia de espécie para espécie.

▼M6

Água

22. A água utilizada no ensaio pode ser qualquer água na qual a taxa de sobrevivência do grupo de controlo da espécie ensaiada seja, pelo menos, tão elevada quanto a verificada na água caracterizada no apêndice 3. A qualidade da água deve manter-se constante durante o ensaio. Para assegurar que a água de diluição não influencia indevidamente o resultado do ensaio (por exemplo por reação com o produto químico em estudo) nem afeta negativamente o desempenho da progenitura, colhem-se regularmente amostras para análise. De três em três meses, por exemplo, caso se saiba que a qualidade da água de diluição se mantém aproximadamente constante, medem-se o carbono orgânico total, a condutividade, o pH e os sólidos em suspensão. Se a qualidade da água suscitar dúvidas, medem-se as concentrações de metais pesados (por exemplo Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), dos principais catiões e aniões (por exemplo Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, SO_4^{2-}) e de pesticidas. O ponto 34 dá mais pormenores sobre a análise química e as amostras de água colhidas.

Soluções utilizadas no ensaio

23. Se isso for possível do ponto de vista prático, deve utilizar-se um sistema de fluxo contínuo. Nos ensaios de fluxo contínuo, tendo em vista a manutenção da série pretendida de concentrações nas cubas utilizadas no ensaio, é necessário um sistema que forneça e dilua continuamente (por exemplo por meio de uma bomba doseadora, de um diluidor proporcional ou de um sistema saturador) uma solução de reserva do produto químico em estudo. Os caudais das soluções de reserva e da água de diluição devem ser verificados regularmente durante o ensaio e não devem variar mais de 10 % ao longo do ensaio. Considera-se adequado um caudal equivalente a, pelo menos, o volume de cinco cubas de ensaio em 24 horas (1). Não deve utilizar-se tubagem de plástico ou outros materiais que possam conter produtos químicos biologicamente ativos ou adsorver o produto químico em estudo.

24. Preferencialmente, prepara-se a solução de reserva sem utilizar solventes, por simples mistura ou agitação do produto químico em estudo na água de diluição, utilizando meios mecânicos (agitação ou dispersão ultrassónica, por exemplo). Caso seja difícil dissolver em água o produto químico em estudo, procede-se como é descrito no documento de orientações da OCDE sobre ensaios de toxicidade em meio aquático de substâncias e misturas difíceis (36). Deve evitar-se a utilização de solventes, embora estes possam ser necessários em alguns casos, para obter uma solução de reserva com a concentração adequada. A referência (36) indica alguns solventes adequados.

25. Os ensaios não devem ser realizados em condições semiestáticas, a menos que possam ser apresentadas razões ponderosas associadas ao produto químico em estudo (por exemplo estabilidade, disponibilidade reduzida, custo elevado ou perigo associado). Na técnica semiestática, podem adotar-se dois métodos de renovação diferentes: ou se preparam novas soluções de ensaio em cubas limpas e se transferem cautelosamente os ovos e larvas sobreviventes para as novas cubas ou se mantêm os organismos em estudo nas cubas de ensaio e se renova diariamente uma parte (pelo menos dois terços) da água utilizada no ensaio.

PROCEDIMENTO DE ENSAIO

Condições de exposição

Colheita de ovos e duração do ensaio

26. Para evitar distorções estatísticas de cariz genético, colhem-se ovos de, pelo menos, três casais ou grupos reprodutores, misturam-se todos os ovos e selecionam-se aleatoriamente os ovos necessários para iniciar o ensaio. Ver no apêndice 11 a descrição da fertilização artificial no caso do esgana-gata. Inicia-se o ensaio o mais rapidamente possível após a fertilização

▼M6

dos ovos, sendo preferível imergir os embriões nas soluções em estudo antes de iniciada a segmentação do blastodisco ou o mínimo de tempo possível após esse estádio, mas não mais de 12 horas após a fertilização. Prossegue-se o ensaio até terminar a diferenciação sexual no grupo de controlo (60 dias após a eclosão no caso do peixe-do-arroz-japonês, do esgana-gata e do peixe-zebra).

Carga

27. O número mínimo de ovos fertilizados no início do ensaio é de 120 por nível de concentração, repartidos por, pelo menos, quatro replicados (admite-se uma atribuição por raiz quadrada ao grupo de controlo). Utilizando tabelas estatísticas de aleatorização, distribuem-se os ovos aleatoriamente pelos grupos expostos. A taxa de carga (ver a definição no apêndice 1) tem de ser suficientemente baixa para que, sem necessidade de arejamento direto das cubas, possa manter-se uma concentração de oxigénio dissolvido não inferior a 60 % do valor da saturação com ar. Para os ensaios de fluxo contínuo, recomenda-se uma taxa de carga não superior a 0,5 g/l em 24 horas e sempre não superior a 5 g/l de solução. O mais tardar 28 dias após a fertilização, redistribuem-se os peixes por replicado em função do número de efetivos, de modo que todos os replicados passem a conter um número de peixes o mais idêntico possível. Se morrerem peixes devido à exposição, reduz-se em conformidade o número de replicados, de modo que a densidade de peixes seja o mais possível idêntica em todos os níveis de exposição.

Luz e temperatura

28. O fotoperíodo e a temperatura da água devem ser adequados à espécie utilizada no ensaio (ver no apêndice 2 as condições experimentais para este ensaio).

Alimentação

29. O regime alimentar dos peixes é um aspeto da maior importância, sendo essencial fornecer o alimento correto para cada estádio a intervalos adequados e em quantidade suficiente para um crescimento normal. O alimento deve ser fornecido *ad libitum*, mas minimizando os excedentes. Para obter um crescimento normal, alimentam-se os peixes pelo menos duas vezes por dia (é aceitável uma dose diária única nos fins de semana), com, pelo menos, três horas de intervalo entre cada fornecimento de alimento. Para evitar a acumulação de resíduos, removem-se o excesso de alimento e as fezes sempre que necessário. Deve procurar aperfeiçoar-se continuamente o regime alimentar em função da experiência adquirida, de modo a melhorar a taxa de sobrevivência e otimizar o crescimento. Deve, portanto, procurar obter-se de peritos reconhecidos a confirmação do regime proposto. Suspende-se a alimentação dos peixes 24 horas antes do termo do ensaio. Indicam-se no apêndice 2 alguns exemplos de regimes alimentares adaptados [ver igualmente a referência (39) da OCDE, relativa a aspetos gerais dos ensaios de toxicidade em peixes].

Concentrações ensaiadas

30. As concentrações do produto químico em estudo devem relacionar-se conforme se indica no apêndice 4. O mínimo a ensaiar são quatro replicados de cada uma de três concentrações diferentes. Na escolha da gama de concentrações a ensaiar, deve atender-se à curva que relaciona a CL_{50} com o período de exposição nos estudos de toxicidade aguda disponíveis. Caso os dados se destinem à avaliação de riscos, recomenda-se o ensaio de cinco concentrações diferentes.

31. Não é necessário ensaiar concentrações do produto químico que excedam 10 % do valor da CL_{50} aguda em adultos ou 10 mg/l, prevalecendo como critério o valor mais baixo. A concentração mais elevada a ensaiar deve corresponder a 10 % da CL_{50} na fase larvar/juvenil.

▼M6

Grupos de controlo

32. Além do ensaio das concentrações de exposição, deve realizar-se um ensaio de controlo da água de diluição (pelo menos 4 replicados) e, se for caso disso, um ensaio de controlo do solvente (pelo menos 4 replicados). Apenas devem ser utilizados nestes ensaios solventes que, comprovadamente, não tenham nenhuma influência com significância estatística nos parâmetros ensaiados.

33. Caso seja utilizado um solvente, a concentração final do mesmo não deve exceder 0,1 ml/l (36) e a concentração de solvente deve ser idêntica em todas as cubas de ensaio, exceto nas do grupo de controlo da água de diluição. No entanto, deve evitar-se o mais possível utilizar solventes; se for utilizado um solvente, a concentração do mesmo deve ser reduzida ao mínimo.

Frequência das medições e das determinações analíticas

34. A fim de verificar a observância dos critérios de aceitação, antes de iniciar o ensaio procede-se à determinação, por análise química, da concentração do produto químico em estudo. No início e no termo do ensaio, analisam-se individualmente todos os replicados. Durante o ensaio, analisa-se, pelo menos uma vez por semana, um replicado de cada concentração ensaiada, percorrendo sistematicamente todos os replicados (1,2,3,4,1,2….). Caso se guardem amostras para análise posterior, é necessário que o método de armazenagem das amostras tenha sido previamente validado. Para garantir que as determinações do produto químico se realizam na verdadeira solução do mesmo, filtram-se (utilizando filtros com porosidade de 0,45 μm, por exemplo) ou centrifugam-se as amostras.

35. Durante o ensaio, medem-se em todas as cubas o oxigénio dissolvido, o pH, a dureza total, a condutividade, a salinidade (se tiver interesse) e a temperatura. O oxigénio dissolvido, a salinidade (se tiver interesse) e a temperatura são medidos, pelo menos, semanalmente; o pH, a condutividade e a dureza, pelo menos no início e no final do ensaio. De preferência, monitoriza-se a temperatura continuamente em, pelo menos, uma das cubas de ensaio.

36. Recomenda-se que os resultados se baseiem em concentrações medidas. Todavia, se, durante todo o ensaio, as concentrações em solução do produto químico em estudo não se tiverem satisfatoriamente desviado mais de 20 % das concentrações nominais, os resultados podem basear-se nos valores nominais ou nos valores medidos.

Exames e medições

Estádio do desenvolvimento embrionário

37. Inicia-se a exposição o mais rapidamente possível após a fertilização, antes de iniciada a segmentação do blastodisco e não mais de 12 horas após a fertilização, a fim de que haja exposição durante as primeiras fases do desenvolvimento embrionário.

Eclosão e sobrevivência

38. O exame da eclosão e da sobrevivência deve ser, pelo menos, diário, registando-se os números apurados. Removem-se os embriões, larvas e peixes juvenis mortos logo que sejam detetados, pois podem decompor-se rapidamente e ser despedaçados pelos outros peixes. A remoção dos indivíduos mortos deve ser extremamente cuidadosa, de modo a não tocar nos ovos e larvas vizinhos e a não os danificar, pois são extremamente frágeis e sensíveis. Os critérios de morte variam de acordo com o estádio vital:

— ovos: particularmente nos estádios iniciais, acentuada perda de transluci-dez e alteração da coloração, causadas por coagulação e/ou precipitação de proteínas e conduzindo a um aspeto branco opaco;

▼M6

— larvas e peixes juvenis: imobilidade e/ou ausência de movimentos respiratórios e/ou ausência de batimentos cardíacos e/ou coloração branca opaca do sistema nervoso central e/ou ausência de reação a estímulos mecânicos.

Aspeto anómalo

39. Regista-se o número de larvas e de peixes cuja forma do corpo seja anormal e descreve-se o aspeto e a natureza da anomalia. A ocorrência de embriões e larvas com anomalias é um fenómeno natural, podendo, nalgumas espécies, afetar alguns pontos percentuais dos efetivos do(s) grupo(s) de controlo. Os animais com aspeto anómalo só são retirados das cubas de ensaio quando morrerem. Todavia, em conformidade com a Diretiva 2010/623/UE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 22 de setembro de 2010, relativa à proteção dos animais utilizados para fins científicos, se das anomalias resultarem dor, sofrimento, angústia ou dano duradouro e a previsão de morte for segura, os animais em causa devem ser anestesiados, eutanasiados conforme se descreve no ponto 44 e tratados como mortalidade na análise dos dados.

Comportamento anómalo

40. Registam-se as anomalias a este nível (por exemplo hiperventilação, natação descoordenada, inatividade atípica e comportamento alimentar atípico) logo que surjam.

Peso

41. No termo do ensaio, eutanasiam-se os peixes sobreviventes (sendo primeiro anestesiados se estiver prevista a colheita de amostras de sangue) e pesam-se um a um (peso húmido de cada peixe enxuto).

Comprimento

42. No termo do ensaio, mede-se cada peixe (comprimento padrão).

43. Estes exames permitem obter e inserir no relatório alguns ou a totalidade dos seguintes dados:

— mortalidade acumulada,

— número de peixes saudáveis no final do ensaio,

— tempo decorrido até ao início e até ao final da eclosão,

— comprimento e peso dos sobreviventes,

— número de larvas deformadas,

— número de peixes com comportamento anómalo.

Colheita de amostras de peixes

44. No final do ensaio procede-se à colheita de amostras dos peixes. Eutanasiam-se os peixes que integram as amostras, por exemplo com MS-222 (100-500 mg por litro, tamponado com 200 mg de $NaHCO_3$ por litro) ou FA-100 (4-alil-2-metoxifenol, sinónimo de eugenol), medem-se um a um e pesam-se individualmente (peso húmido enxuto); ou então anestesiam-se, se for necessário colher uma amostra de sangue (ver o ponto 49).

Colheita de amostras para análise da vitelogenina e determinação do sexo por avaliação histológica

45. Todos os peixes vão integrar as amostras e ser preparados para a determinação do sexo e a análise da vitelogenina. Procede-se em todos os peixes a uma análise histológica para determinação do sexo. Para a análise da vitelogenina,

▼M6

aceita-se a constituição de subamostras compostas por, pelo menos, 16 peixes de cada replicado. Se os resultados obtidos para as subamostras forem pouco claros, é necessário efetuar a análise da vitelogenina a mais peixes.

46. A constituição das amostras para análise da vitelogenina e para determinação do sexo depende do método de análise da vitelogenina.

Método do homogeneizado da cabeça e da cauda para análise da vitelogenina

47. Eutanasiam-se os peixes. Separam-se do corpo a cabeça e a cauda de cada peixe efetuando os cortes com um bisturi imediatamente atrás das barbatanas peitorais e imediatamente atrás da barbatana dorsal (ver a figura 1). Reúnem-se a cabeça e a cauda de cada peixe, pesa-se este conjunto e numera-se cada conjunto de cabeça e cauda, após o que se congela em azoto líquido e se conserva a – 70 °C, ou a temperatura inferior, para a análise da vitelogenina. Numera-se o resto do corpo de cada peixe e fixa-se essa parte com um fixador apropriado para avaliação histológica (22). O recurso a este método permite determinar a vitelogenina e efetuar uma avaliação histopatológica em cada peixe, pelo que pode relacionar-se uma variação do nível de vitelogenina com o sexo fenotípico ou (no caso do peixe-do-arroz-japonês e do esgana-gata) com o sexo genético do peixe. Para mais informações, ver as orientações relativas à homogeneização (apêndice 5) e as orientações relativas à determinação quantitativa da vitelogenina (apêndice 6).

Método do homogeneizado hepático para análise da vitelogenina

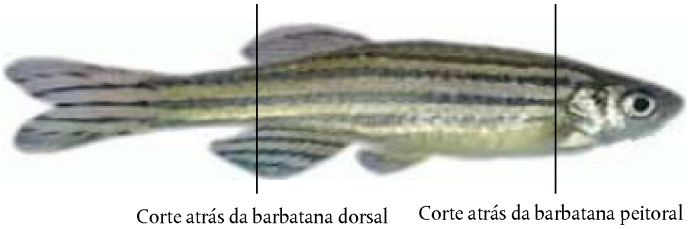
48. Eutanasiam-se os peixes. Disseca-se o fígado e conserva-se a – 70 °C ou a temperatura inferior. O *Test Guideline* 229 da OCDE (37) e o capítulo C.37 deste anexo (38) descrevem procedimentos recomendados para a excisão e o pré-tratamento dos fígados. Em seguida, homogeneíza-se separadamente cada fígado como se explica no *Test Guideline* 229 da OCDE (37) ou no capítulo C.37 deste anexo. Utiliza-se o sobrenadante para determinar a vitelogenina recorrendo a uma técnica ELISA homóloga — ver exemplos de determinação quantitativa no apêndice 6 (peixe-zebra) ou no *Test Guideline* 229 da OCDE (37) (peixe-do-arroz-japonês). Por esta via, também é possível obter dados por peixe da vitelogenina e da histologia das gónadas.

Método do plasma sanguíneo para análise da vitelogenina

49. Colhe-se sangue do peixe anestesiado, por punção cardíaca, na veia caudal ou por corte da cauda, e centrifuga-se a amostra a 4 °C para separar o plasma. Conserva-se o plasma a – 70 °C ou a temperatura inferior até ser utilizado. Eutanasia-se o peixe e fixa-se o peixe inteiro para a histologia. Numeram-se individualmente as amostras de plasma e os peixes, para se poder relacionar o nível de vitelogenina com o sexo do peixe correspondente.

Figura 1:

Modo de cortar um peixe para a determinação da vitelogenina no homogeneizado da cabeça e da cauda e para a avaliação histológica da secção intermédia (corte atrás da barbatana dorsal e atrás da barbatana peitoral).



▼M6

Determinação do sexo genético

50. Nas espécies para as quais existem marcadores adequados, colhe-se uma amostra biológica em cada peixe para determinação do sexo genético. No caso do peixe-do-arroz-japonês, colhe-se a barbatana anal ou a barbatana dorsal. O apêndice 9 apresenta uma descrição pormenorizada, nomeadamente da colheita dos tecidos e da determinação do sexo por um método PCR. No apêndice 10, apresenta-se igualmente uma descrição da colheita dos tecidos e da determinação do sexo por um método PCR no caso do esgana-gata.

Determinação quantitativa da vitelogenina

51. A determinação quantitativa da vitelogenina deve ser realizada por um método analítico quantitativo validado. Deve dispor-se de informações sobre a variabilidade do método utilizado nos ensaios realizados num laboratório, bem como sobre a variabilidade de ensaio para ensaio no mesmo laboratório. A variabilidade interlaboratorial e intralaboratorial depende (muito provavelmente) do estádio de desenvolvimento (variável) da população de peixes. Dada a variabilidade da determinação quantitativa da vitelogenina, há que ser prudente na interpretação de concentrações sem efeitos observáveis (NOEC) baseadas unicamente neste parâmetro. Existem vários métodos que permitem avaliar a produção de vitelogenina da espécie de peixes utilizada no ensaio. O método ELISA é uma técnica quantitativa relativamente sensível e específica de determinação de concentrações proteicas. É necessário utilizar anticorpos homólogos (ativos em relação a vitelogenina da mesma espécie) e, especialmente importante, padrões homólogos.

Determinação do sexo

52. Consoante o método de constituição da amostra destinada à determinação da vitelogenina, coloca-se cada peixe inteiro ou a secção intermédia restante de cada peixe numa caixinha de tratamento pré-rotulada e procede-se à fixação com um fixador adequado para a determinação histológica do sexo (facultativamente também para a avaliação do estádio de desenvolvimento das gónadas). O apêndice 7 e o documento de orientações da OCDE sobre o diagnóstico de histopatologias de tipo endócrino em gónadas de peixes (22) contêm orientações sobre a fixação e o embebimento. Depois de tratado, embebe-se cada peixe num bloco de parafina. Dispõem-se os peixes longitudinalmente nos blocos de parafina. Efetuam-se em cada peixe, pelo menos, seis cortes longitudinais, com 3 a 5 μm de espessura, segundo um plano frontal, que abranjam tecido de ambas as gónadas. O intervalo entre esses cortes é de aproximadamente 50 μm nos machos e 250 μm nas fêmeas. Todavia, dado que é frequente estarem presentes machos e fêmeas no mesmo bloco (caso sejam embebidos vários peixes em cada bloco), o intervalo entre os cortes realizados por bloco deve ser de aproximadamente 50 μm, até se obterem, pelo menos, seis cortes das gónadas de cada macho. Em seguida, pode ampliar-se o intervalo entre os cortes para 250 μm, para as fêmeas. Coloram-se os cortes com hematoxilina e eosina e examinam-se com um microscópio ótico, para determinação do sexo (macho, fêmea, intersexual ou indiferenciado). A intersexualidade é definida pela presença de mais de um ovócito nos testículos por conjunto de seis cortes examinados ou pela presença (sim ou não) de células espermatogénicas nos ovários. A histopatologia e a classificação do estádio de desenvolvimento dos ovários e dos testículos é facultativa, mas, se forem realizadas, os resultados obtidos devem ser analisados estatisticamente e incluídos no relatório. É de referir que algumas espécies de peixes não têm, na natureza, um par de gónadas totalmente desenvolvido, podendo estar presente apenas uma gónada (caso do peixe-do-arroz-japonês e, por vezes, do peixe-zebra). É conservado registo dos resultados de todos estes exames.

53. A determinação do sexo genético no peixe-do-arroz-japonês baseia-se na presença ou ausência do gene DMY, que determina o sexo masculino nesta espécie, localizado no cromossoma Y. Pode determinar-se o sexo genotípico

▼M6

de exemplares de peixe-do-arroz-japonês por sequenciação do gene DMY a partir de ADN extraído, por exemplo, de um fragmento de barbatana anal ou de barbatana dorsal. A presença do gene DMY indica que se trata de um indivíduo do sexo masculino (XY), independentemente do fenótipo que evidencie; a ausência do gene DMY indica que se trata de um indivíduo do sexo feminino (XX), independentemente do fenótipo que evidencie (23). O apêndice 9 fornece orientações sobre a preparação dos tecidos e o método PCR. A determinação do sexo genético de esgana-gatas também se faz por um método PCR, descrito no apêndice 10.

54. Os casos de intersexualidade (ver a definição no apêndice 1) devem ser referidos no relatório.

Caracteres sexuais secundários

55. Em espécies como o peixe-do-arroz-japonês, os caracteres sexuais secundários estão sob controlo do sistema endócrino. Por conseguinte, o exame do aspeto físico de cada peixe deve, se possível, ser efetuado no final da exposição. No peixe-do-arroz-japonês, a formação de tubérculos papilares na parte posterior da barbatana anal das fêmeas é sensível aos androgénios. O capítulo C.37 deste anexo (38) contém fotografias elucidativas dos caracteres sexuais secundários masculinos e de fêmeas androgenisadas.

DADOS E RELATÓRIOS

Tratamento dos resultados

56. É importante recorrer ao teste estatístico válido mais poderoso para determinar o valor do parâmetro em causa. A unidade experimental é o replicado, mas é necessário ter em conta no teste estatístico a variabilidade interna dos replicados. O fluxograma de decisão do apêndice 8 visa facilitar a escolha do teste estatístico mais adequado a utilizar, com base nas características dos dados obtidos no ensaio. O nível de significância estatística é de 0,05 para todos os parâmetros contemplados.

Proporção de cada sexo e sexo genético

57. Se a resposta à dosagem for uma função monótona, recorre-se ao teste de Jonckheere-Terpstra (teste de tendência) para ajuizar da existência de efeitos com significância (abordagem NOEC/LOEC) da exposição na proporção dos sexos. Se a relação não for monótona, utiliza-se um teste de comparações par a par: em caso de normalidade e de variância homogénea, utiliza-se o teste de Dunnett; em caso de variância heterogénea, utiliza-se o teste de Tamhane-Dunnett; nos outros casos, utiliza-se um teste exato de Mann-Whitney com ajustamento de Bonferroni-Holm. O apêndice 8 contém um fluxograma para a análise estatística das proporções dos sexos. Estas apresentam-se em quadros de proporção de concentração ± desvio-padrão de machos, fêmeas, peixes intersexuais e peixes de sexo indiferenciado. Deve destacar-se a significância estatística. Apresentam-se exemplos no relatório de validação da fase 2 do Ensaio de Desenvolvimento Sexual em Peixes (42). O sexo genético é referido no relatório em percentagem de inversão do sexo fenotípico em machos, fêmeas, peixes intersexuais e peixes indiferenciados.

Concentrações de vitelogenina

58. Analisam-se as concentrações de vitelogenina para ajuizar da existência de efeitos com significância (abordagem NOEC/LOEC) da exposição. É preferível o teste de Dunnett ao teste t com correção de Bonferroni. Caso se utilize uma correção de Bonferroni, é preferível a correção de Bonferroni-Holm. Tendo em vista a normalidade e uma variância homogénea, admite-se uma transformação logarítmica da concentração de vitelogenina. Se a resposta à concentração for coerente com uma função monótona, é preferível o teste de Jonckheere-Terpstra a qualquer dos já referidos. Caso se utilize um teste t ou o teste de Dunnett, é desnecessário um teste F de significância (análise de variância) para prosseguir. Ver mais pormenores no fluxograma do apêndice 8. Os resultados apresentam-se em quadros de média de concentração ± desvio-padrão de machos, fêmeas, peixes intersexuais e peixes

▼M6

de sexo indiferenciado, separadamente. Deve destacar-se a significância estatística associada às fêmeas fenotípicas e aos machos fenotípicos. Apresentam-se exemplos no relatório de validação da fase 2 do Ensaio de Desenvolvimento Sexual em Peixes (42).

Concentrações reais do produto químico em estudo

59. As frequências de análise da concentração real, nas cubas, do produto químico em estudo são indicadas no ponto 34. Os resultados apresentam-se em quadros de concentração média ± desvio-padrão por replicado e por concentração, destacando o número de amostras e os resultados aberrantes relativamente à concentração média de exposição ± 20 %. Apresentam-se exemplos no relatório de validação da fase 2 do Ensaio de Desenvolvimento Sexual em Peixes (42).

Interpretação dos resultados

60. Os resultados do ensaio devem ser interpretados com prudência quando as concentrações do produto químico em estudo medidas nas soluções de ensaio são próximas do limite de deteção do método analítico.

Relatório do ensaio

61. Elementos a constar do relatório do ensaio:

Produto químico em estudo

— propriedades físico-químicas pertinentes, dados de identificação química, incluindo o grau de pureza e o método analítico de determinação quantitativa do produto químico em estudo.

Condições de realização do ensaio

— protocolo experimental utilizado (fluxo contínuo, semiestático/com renovação); planeamento do ensaio, incluindo as concentrações ensaiadas, o método de preparação das soluções de reserva (em anexo) e a frequência de renovação (indicar o agente de solubilização e a concentração deste, quando utilizado);

— concentrações nominais ensaiadas, médias dos valores medidos nas cubas de ensaio e desvios-padrão correspondentes, bem como o método utilizado para os obter (o método analítico utilizado deve ser descrito em anexo); elementos comprovativos de que as medições dizem respeito às concentrações reais em solução do produto químico em estudo;

— qualidade da água nas cubas de ensaio: pH, dureza, temperatura e concentração de oxigénio dissolvido;

— informações pormenorizadas sobre a alimentação dos peixes — por exemplo, tipo(s) de alimento, proveniência do(s) mesmo(s), quantidade e frequência do fornecimento de alimento e, se for caso disso, resultados das análises de contaminantes (por exemplo bifenilos policlorados, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e pesticidas organoclorados).

Resultados

— elementos comprovativos de que os grupos de controlo satisfizeram os critérios de validade do ensaio: os dados relativos à eclosão são apresentados em quadros de percentagem por replicado e por concentração, destacando os resultados aberrantes relativamente aos critérios de aceitação (nos grupos de controlo); os dados relativos à sobrevivência são apresentados em percentagem por replicado e por concentração, destacando os resultados aberrantes relativamente aos critérios de validação (nos grupos de controlo);

— indicação clara dos resultados obtidos para os diversos parâmetros examinados: sobrevivência dos embriões e êxito da eclosão; anomalias externas; comprimento e peso; medições da vitelogenina (ng/g de homogeneizado, ng/ml de plasma ou ng/mg de fígado); dados

▼M6

relativos à histologia das gónadas, ao rácio sexual e ao sexo genético; incidência de quaisquer reações inabituais dos peixes e de quaisquer efeitos visíveis gerados pelo produto químico em estudo.

62. Apresentam-se os resultados sob a forma de valor médio ± desvio-padrão ou valor médio ± erro-padrão. Os resultados estatísticos mínimos são o NOEC (concentração sem efeitos observáveis), o LOEC (menor concentração com efeitos observáveis) e os intervalos de confiança. Deve utilizar-se o fluxograma estatístico do apêndice 8.

REFERÊNCIAS

1) OCDE (1992). *Fish, Early Life Stage Toxicity Test*. Test Guideline No. 210, Guidelines for the Testing of Chemicals. OCDE, Paris.

2) Jobling, S., Sheahan, D., Osborne, J.A., Matthiessen, P., Sumpter, J.P. (1996). Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15, pp. 194-202.

3) Sumpter, J.P., Jobling, S. (1995). Vitellogenesis As A Biomarker for Estrogenic Contamination of the Aquatic Environment. *Environmental Health Perspectives*, 103, pp. 173-178.

4) Tyler, C.R., van Aerle, R., Hutchinson, T.H., Maddix, S., Trip, H. (1999). An *in vivo* testing system for endocrine disruptors in fish early life stages using induction of vitellogenin. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18, pp. 337-347.

5) Holbech, H., Andersen, L., Petersen, G.I., Korsgaard, B., Pedersen, K.L., Bjerregaard, P. (2001a). Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, C-Toxicology & Pharmacology, 130, pp. 119-131.

6) Andersen, L., Bjerregaard, P., Korsgaard, B. (2003). Vitellogenin induction and brain aromatase activity in adult male and female zebrafish exposed to endocrine disrupters. *Fish Physiology and Biochemistry*, 28, pp. 319-321.

7) Orn, S., Holbech, H., Madsen, T.H., Norrgren, L., Petersen, G.I. (2003) Gonad development and vitellogenin production in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to ethinylestradiol and methyltestosterone. *Aquatic Toxicology*, 65, pp. 397-411.

8) Panter, G.H., Hutchinson, T.H., Lange, R., Lye, C.M., Sumpter, J.P., Zerulla, M., Tyler, C.R. (2002). Utility of a juvenile fathead minnow screening assay for detecting (anti-)estrogenic substances. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21, pp. 319-326.

9) Sun, L.W., Zha, J.M., Spear, P.A., Wang, Z.J. (2007). Toxicity of the aromatase inhibitor letrozole to Japanese medaka (*Oryzias latipes*) eggs, larvae and breeding adults. *Comparative Biochemistry and Physiology*, C-Toxicology & Pharmacology, 145, pp. 533-541.

10) Parks, L.G., Cheek, A.O., Denslow, N.D., Heppell, S.A., McLachlan, J.A., LeBlanc, G.A., Sullivan, C.V. (1999). Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. *Comparative Biochemistry and Physiology*, C-Toxicology & Pharmacology, 123, pp. 113-125.

11) Brion, F., Nilsen, B.M., Eidem, J.K., Goksoyr, A., Porcher, J.M. (2002). Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21, pp. 1699-1708.

12) Nishi, K., Chikae, M., Hatano, Y., Mizukami, H., Yamashita, M., Sakakibara, R., Tamiya, E. (2002). Development and application of a monoclonal antibody-based sandwich ELISA for quantification of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) vitellogenin. *Comparative Biochemistry and Physiology*, C-Toxicology & Pharmacology, 132, pp. 161-169.

13) Hahlbeck, E., Katsiadaki, I., Mayer, I., Adolfsson-Erici, M., James, J., Bengtsson, B.E. (2004). The juvenile three-spined stickleback

▼M6

(*Gasterosteus aculeatus* L.) as a model organism for endocrine disruption — II — kidney hypertrophy, vitellogenin and spiggin induction. *Aquatic Toxicology*, 70, pp. 311-326.

14) Tatarazako, N., Koshio, M., Hori, H., Morita, M., Iguchi, T. (2004). Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the medaka. *Journal of Health Science*, 50, pp. 301-308.

15) Eidem, J.K., Kleivdal, H., Kroll, K., Denslow, N., van Aerle, R., Tyler, C., Panter, G., Hutchinson, T., Goksoyr, A. (2006). Development and validation of a direct homologous quantitative sandwich ELISA for fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin. *Aquatic Toxicology*, 78, pp. 202-206.

16) Jensen, K.M., Ankley, G.T. (2006). Evaluation of a commercial kit for measuring vitellogenin in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 64, pp. 101-105.

17) Holbech, H., Petersen, G.I., Norman, A., Örn, S., Norrgren, L., Bjerregaard, P. (2001b). Suitability of zebrafish as test organism for detection of endocrine disrupting chemicals. Comparison of vitellogenin in plasma and whole body homogenate from zebrafish (*Danio rerio*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Nordic Council of Ministers. *TemaNord*, 2001:597, pp. 48--51.

18) Nilsen, B.M., Berg, K., Eidem, J.K., Kristiansen, S.I., Brion, F., Porcher, J.M., Goksoyr, A. (2004). Development of quantitative vitellogenin-ELISAs for fish test species used in endocrine disruptor screening. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378, pp. 621-633.

19) Orn, S., Yamani, S., Norrgren, L. (2006). Comparison of vitellogenin induction, sex ratio, and gonad morphology between zebrafish and Japanese medaka after exposure to 17 alpha-ethinylestradiol and 17 beta-trenbolone. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 51, pp. 237-243.

20) Scholz, S., Kluver, N. (2009). Effects of Endocrine Disrupters on Sexual, Gonadal Development in Fish. *Sexual Development*, 3, pp. 136-151.

21) Fenske, M., Maack, G., Schafers, C., Segner, H. (2005). An environmentally relevant concentration of estrogen induces arrest of male gonad development in zebrafish, *Danio rerio*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24, pp. 1088-1098.

22) OCDE (2010). *Guidance Document on the Diagnosis of Endocrine-related Histopathology in Fish Gonads*. Series on Testing and Assessment, No. 123, ENV/JM/MONO(2010)14. OCDE, Paris.

23) Kobayashi, T., Matsuda, M., Kajiura-Kobayashi, H., Suzuki, A., Saito, N., Nakamoto, M., Shibata, N., Nagahama, Y. (2004). Two DM domain genes, DMY and DMRT1, involved in testicular differentiation and development in the medaka, *Oryzias latipes*. *Developmental Dynamics*, 231, pp. 518-526.

24) Shinomiya, A., Otake, H., Togashi, K., Hamaguchi, S., Sakaizumi, M. (2004). Field survey of sex-reversals in the medaka, *Oryzias latipes*: genotypic sexing of wild populations. *Zoological Science*, 21, pp. 613-619.

25) Kidd, K.A., Blanchfield, P.J., Mills, K.H., Palace, V.P., Evans, R.E., Lazorchak, J.M., Flick, R.W. (2007). Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, pp. 8897-8901.

26) Palace,V.P., Evans, R.E. Wautier, K.G., Mills, K.H., Blanchfield, P.J., Park, B.J., Baron, C.L., Kidd, K.A. (2009). Interspecies differences in biochemical, histopathological, and population responses in four wild fish species exposed to ethynylestradiol added to a whole lake. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 66, pp. 1920-1935.

27) Panter, G.H., Hutchinson, T.H., Hurd, K.S., Bamforth, J., Stanley, R.D., Duffell, S., Hargreaves, A., Gimeno, S., Tyler, C.R. (2006). Development of chronic tests for endocrine active chemicals — Part 1. An extended fish early-life stage test for oestrogenic active chemicals in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Aquatic Toxicology*, 77, pp. 279-290.

▼**M6**

28) Holbech, H., Kinnberg, K., Petersen, G.I., Jackson, P., Hylland, K., Norrgren, L., Bjerregaard, P. (2006). Detection of endocrine disrupters: Evaluation of a Fish Sexual Development Test (FSDT). *Comparative Biochemistry and Physiology*, C-Toxicology & Pharmacology, 144, pp. 57-66.

29) Andersen, L., Kinnberg, K., Holbech, H., Korsgaard, B., Bjerregaard, P. (2004). Evaluation of a 40 day assay for testing endocrine disrupters: Effects of an anti-estrogen and an aromatase inhibitor on sex ratio and vitellogenin concentrations in juvenile zebrafish (*Danio rerio*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 30, pp. 257-266.

30) Morthorst, J.E., Holbech, H., Bjerregaard, P. (2010). Trenbolone causes irreversible masculinization of zebrafish at environmentally relevant concentrations. *Aquatic Toxicology*, 98, pp. 336-343.

31) Kiparissis,Y., Metcalfe, T.L., Balch, G.C., Metcalf, C.D. (2003). Effects of the antiandrogens, vinclozolin and cyproterone acetate on gonadal development in the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Aquatic Toxicology*, 63, pp. 391-403.

32) Panter, G.H., Hutchinson, T.H. Hurd, K.S., Sherren, A., Stanley, R.D., Tyler, C.R. (2004). Successful detection of (anti-) androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (*Pimephales promelas*) using easily measured endpoints of sexual development. *Aquatic Toxicology*, 70, pp. 11-21.

33) Kinnberg, K., Holbech, H., Petersen, G.I., Bjerregaard, P. (2007). Effects of the fungicide prochloraz on the sexual development of zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, C-Toxicology & Pharmacology, 145, pp. 165-170.

34) Capítulo C.14 deste anexo: Ensaio de crescimento juvenil em peixes.

35) Capítulo C.4 deste anexo: Biodegradabilidade «fácil».

36) OCDE (2000). *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*. Series on Testing and Assessment, No. 23. OCDE, Paris.

37) OCDE (2009). *Fish Short Term Reproduction Assay*. Test Guideline No. 229. Guidelines for the Testing of Chemicals. OCDE, Paris.

38) Capítulo C.37 deste anexo: Ensaio a 21 dias em peixes: Despistagem a curto prazo de atividade estrogénica e androgénica e de inibição da aromatase.

39) OCDE (2012). Fish Toxicity Testing Framework, Series on Testing and Assessment, No. 171. OCDE, Paris.

40) Schäfers, C., Teigeler, M., Wenzel, A., Maack, G., Fenske, M., Segner, H. (2007). Concentration- and time-dependent effects of the synthetic estrogen, 17alpha-ethinylestradiol, on reproductive capabilities of the zebrafish, *Danio rerio*. *Journal of Toxicology and Environmental Health*-Part A, 70, 9-10, pp. 768-779.

41) OCDE (2011). *Validation Report (Phase 1) for the Fish Sexual Development Test*. Series on Testing and Assessment, No. 141, ENV/JM/MONO(2011)22. OCDE, Paris.

42) OCDE (2011). *Validation Report (Phase 2) for the Fish Sexual Development Test*. Series on Testing and Assessment, No. 142, ENV/JM/MONO(2011)23. OCDE, Paris.

43) OCDE (2011). *Peer Review Report of the validation of the Fish Sexual Development Test*. Series on Testing and Assessment, No. 143, ENV/JM/ /MONO(2011)24. OCDE, Paris.

44) Diretiva 2010/63/UE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 22 de setembro de 2010, relativa à proteção dos animais utilizados para fins científicos. JO L 276 de 20.10.2010, p. 33.

▼M6

Apêndice 1

Abreviaturas e definições

Parâmetro apical: Indicador de efeitos ao nível de toda a população.

VSA: Valor da saturação com ar.

Biomarcador: Indicador de efeitos ao nível individual.

Produto químico: Substância ou mistura.

Dae: Dias após a eclosão.

DMY: Gene do domínio DM específico do cromossoma Y, necessário ao desenvolvimento masculino no peixe-do-arroz-japonês.

ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*): Ensaio de imunossorção com ligação enzimática.

Peso de peixe: Peso húmido de peixe (enxuto).

EDSP: Ensaio de desenvolvimento sexual em peixes.

Eixo HHG: Eixo hipotálamo-hipófise-gónadas.

Peixe intersexual: Peixe com mais de um ovócito nos testículos (por série de seis cortes analisados) ou com células espermatogénicas nos ovários (ocorrência ou não).

Taxa de carga: Peso húmido de peixe por volume de água.

MDA: Modo de ação.

RT-PCR: Reação em cadeia da polimerase após transcriptase inversa.

Produto químico em estudo: Qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado este método de ensaio.

Peixe indiferenciado: Peixe cujas gónadas não apresentam células germinativas visíveis.

VTG: Vitelogenina.

▼**M6**

Apêndice 2

Condições experimentais do ensaio de desenvolvimento sexual em peixes (espécies de água doce)

1. Espécies recomendadas	Peixe-do-arroz-japonês (*Oryzias latipes*)	Peixe-zebra (*Danio rerio*)	Esgana-gata (*Gasterosteus aculeatus*)
2. Tipo de ensaio	Fluxo contínuo ou ensaio semiestático	Fluxo contínuo ou ensaio semiestático	Fluxo contínuo ou ensaio semiestático
3. Temperatura da água	25 ± 2 °C	27 ± 2 °C	20 ± 2 °C
4. Iluminação	Lâmpadas fluorescentes (espetro largo)	Lâmpadas fluorescentes (espetro largo)	Lâmpadas fluorescentes (espetro largo)
5. Intensidade luminosa	10-20 μE/m^2/s, 540--1 080 lux ou 50-100 ft-c (níveis ambientes no laboratório)	10-20 μE/m^2/s, 540--1 080 lux ou 50-100 ft-c (níveis ambientes no laboratório)	10-20 μE/m^2/s, 540--1 080 lux ou 50-100 ft-c (níveis ambientes no laboratório)
6. Fotoperíodo	12-16 horas de luz seguidas de 8-12 horas de escuridão	12-16 horas de luz seguidas de 8-12 horas de escuridão	16 horas de luz seguidas de 8 horas de escuridão
7. Volume mínimo das cubas	7 litros de água por cuba	7 litros de água por cuba	7 litros de água por cuba
8. Substituição total do volume de solução em cada cuba	Mínimo 5 diárias	Mínimo 5 diárias	Mínimo 5 diárias
9. Idade dos organismos utilizados no ensaio, no início da exposição	Ovos recentemente fertilizados (estádio de blástula inicial)	Ovos recentemente fertilizados (estádio de blástula inicial)	Ovos recentemente fertilizados
10. Número de ovos por concentração de exposição	Mínimo 120	Mínimo 120	Mínimo 120
11. Número de concentrações de exposição	Mínimo 3 (mais as cubas de controlo adequadas)	Mínimo 3 (mais as cubas de controlo adequadas)	Mínimo 3 (mais as cubas de controlo adequadas)
12. Número de replicados por concentração de exposição	Mínimo 4 (exceto atribuição por raiz quadrada ao grupo de controlo)	Mínimo 4 (exceto atribuição por raiz quadrada ao grupo de controlo)	Mínimo 4 (exceto atribuição por raiz quadrada ao grupo de controlo)
13. Alimentação	Artémias vivas, artémias adultas congeladas, alimento em flocos para peixes etc. Recomenda-se que os peixes sejam alimentados duas vezes por dia.	Alimento especial para alevins, artémias vivas, artémias adultas congeladas, alimento em flocos para peixes etc. Recomenda-se que os peixes sejam alimentados duas vezes por dia.	Artémias vivas, artémias adultas congeladas, alimento em flocos para peixes etc. Recomenda-se que os peixes sejam alimentados duas vezes por dia.
14. Arejamento	Nenhum, salvo se a concentração de oxigénio dissolvido descer abaixo de 60 % do valor de saturação	Nenhum, salvo se a concentração de oxigénio dissolvido descer abaixo de 60 % do valor de saturação	Nenhum, salvo se a concentração de oxigénio dissolvido descer abaixo de 70 % do valor de saturação

▼**M6**

15. Água de diluição	Água de superfície, de poço ou reconstituída, limpa	Água de superfície, de poço ou reconstituída, limpa	Água de superfície, de poço ou reconstituída, limpa
16. Duração da exposição ao produto químico em estudo	60 dias após a eclosão	60 dias após a eclosão	60 dias após a eclosão
17. Parâmetros biológicos	Êxito da eclosão, sobrevivência, morfologia macroscópica, vitelogenina, histologia das gónadas, sexo genético, rácio sexual	Êxito da eclosão, sobrevivência, morfologia macroscópica, vitelogenina, histologia das gónadas, rácio sexual	Êxito da eclosão, sobrevivência, morfologia macroscópica, vitelogenina, histologia das gónadas, rácio sexual
18. Critérios de aceitabilidade do ensaio aplicados aos replicados de controlo reunidos	Êxito da eclosão > 80 %	Êxito da eclosão > 80 %	Êxito da eclosão > 80 %
	Sobrevivência após a eclosão ≥ 70 %	Sobrevivência após a eclosão ≥ 70 %	Sobrevivência após a eclosão ≥ 70 %
	Crescimento (peso húmido de peixe enxuto) > 150 mg	Crescimento (peso húmido de peixe enxuto) > 75 mg	Crescimento (peso húmido de peixe enxuto) > 120 mg
	Comprimento (padrão) > 20 mm	Comprimento (padrão) > 14 mm	Comprimento (padrão) > 20 mm
	Rácio sexual (percentagem de machos ou de fêmeas): 30-70 %	Rácio sexual (percentagem de machos ou de fêmeas): 30-70 %	Rácio sexual (percentagem de machos ou de fêmeas): 30-70 %

▼**M6**

Apêndice 3

Características químicas de uma água de diluição aceitável

COMPONENTE	CONCENTRAÇÃO
Partículas	< 20 mg/l
Carbono orgânico total	< 2 mg/l
Amoníaco não-ionizado	< 1 µg/l
Cloro residual	< 10 µg/l
Pesticidas organofosforados totais	< 50 ng/l
Soma dos pesticidas organoclorados e dos bifenilos policlorados, totais	< 50 ng/l
Cloro orgânico total	< 25 ng/l

▼**M6**

Apêndice 4

Orientações relativas às concentrações a utilizar nos ensaios (extraídas do método C.14)

Coluna (número de concentrações entre 100 e 10 ou entre 10 e 1) (*)						
1	2	3	4	5	6	7
100	100	100	100	100	100	100
32	46	56	63	68	72	75
10	22	32	40	46	52	56
3,2	10	18	25	32	37	42
1,0	4,6	10	16	22	27	32
	2,2	5,6	10	15	19	24
	1,0	3,2	6,3	10	14	18
		1,8	4,0	6,8	10	13
		1,0	2,5	4,6	7,2	10
			1,6	3,2	5,2	7,5
			1,0	2,2	3,7	5,6
				1,5	2,7	4,2
				1,0	1,9	3,2
					1,4	2,4
					1,0	1,8
						1,3
						1,0

(*) Pode escolher-se uma série de três (ou mais) concentrações sucessivas de uma coluna. Os pontos intermédios entre as concentrações de uma coluna x encontram-se na coluna 2x + 1. Os valores listados podem representar concentrações expressas em percentagem por volume ou em peso (mg/l ou µg/l). Os valores podem ser multiplicados ou divididos por qualquer potência de 10, conforme seja apropriado. Caso exista uma incerteza considerável relativamente ao nível de toxicidade, pode usar-se a coluna 1.

▼M6

Apêndice 5

Orientações relativas à homogeneização da cabeça e da cauda de peixes-zebra, vairões-de-cabeça-gorda, esgana-gatas e peixes-do-arroz-japoneses juvenis

Este apêndice visa descrever os procedimentos que precedem a determinação quantitativa da concentração de vitelogenina. Podem ser aplicados outros protocolos, desde que o resultado da determinação quantitativa da vitelogenina seja comparável. Em alternativa à determinação no homogeneizado da cabeça e da cauda, pode determinar-se a concentração de vitelogenina no plasma sanguíneo ou no fígado.

Procedimento de ensaio

1. Anestesia-se e eutanasia-se cada peixe conforme consta da descrição do ensaio.

2. Cortam-se a cabeça e a cauda de cada peixe conforme consta da descrição do ensaio. **Importante:** Para evitar que machos não-induzidos sejam contaminados por vitelogenina proveniente de fêmeas ou de machos induzidos, é necessário lavar e limpar corretamente (por exemplo com etanol a 96 %) os instrumentos de dissecação e a placa de corte antes de passar ao peixe seguinte.

3. Pesa-se com aproximação de 1 mg o conjunto da cabeça e da cauda de cada peixe.

4. Após pesagem, colocam-se ambas as partes em tubos adequados (por exemplo tubos de Eppendorf de 1,5 ml) e congela-se a – 80 °C até à homogeneização ou procede-se a homogeneização imediata sobre gelo com dois pilões de plástico. (Podem ser utilizados outros métodos, se forem realizados sobre gelo e deles resultar uma massa homogénea). **Importante:** *É necessário numerar corretamente os tubos, a fim de que a cabeça e a cauda de cada peixe possam ser relacionadas com o resto do corpo correspondente, utilizado na histologia das gónadas.*

5. Uma vez homogeneizada a massa, adiciona-se uma quantidade de **tampão de homogenização** (*) gelado correspondente a quatro a dez vezes o peso dos tecidos. A mistura deve continuar a ser homogeneizada com os pilões até o estar completamente. **Nota importante:** *É necessário utilizar pilões novos para cada peixe.*

6. Colocam-se as amostras em gelo até à centrifugação a **4 °C**, durante 30 minutos, a 50 000 g.

7. Por meio de uma pipeta, transferem-se volumes de 20 a 50 µl (anotar o volume) do sobrenadante para, **pelo menos, dois** tubos, mergulhando para o efeito a ponta da pipeta através da camada superficial lipídica e aspirando cuidadosamente sobrenadante sem resíduos da fração lipídica nem da camada depositada.

8. Armazenam-se os tubos a – 80 °C até serem utilizados.

(*) *Tampão de homogeneização:*

Tris-HCl 50 mM, pH 7,4; 1 % da mistura de inibidores de proteases da Sigma: 12 ml de Tris-HCl, pH 7,4, + 120 µl da mistura de inibidores de proteases (ou de uma mistura de inibidores de proteases equivalente).

TRIS: TRIS-ULTRAPURO (ICN)

Mistura de inibidores de proteases: da Sigma, para tecidos de mamíferos (n.º do produto **P8340**).

Nota: O tampão de homogeneização tem de ser utilizado no próprio dia de preparação e de ser mantido em gelo durante esse período.

▼M6

Apêndice 6

Orientações relativas à determinação quantitativa da vitelogenina em homogeneizados da cabeça e da cauda de peixes-zebra (*Danio rerio*) (modificado a partir de Holbech *et al.*, 2001) — admite-se o recurso a outros protocolos que utilizem padrões e anticorpos homólogos

1. Descongelam-se placas de microtitulação (Maxisorp F96 certificadas da Nunc, Roskilde, Dinamarca) previamente revestidas com IgG antilipovitelina de peixe-zebra a 5 µg/ml e lavam-se três vezes com tampão de lavagem (*).

2. Dilui-se padrão de vitelogenina de peixe-zebra purificada ([1]) a 0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10 e 20 ng/ml com tampão de diluição (**) e diluem-se as amostras pelo menos 200 vezes (para evitar o efeito da matriz) em tampão de diluição, após o que se aplicam padrões e amostras às placas. Constitui-se nas placas um controlo do ensaio em duplicado. Introduz-se um volume de 150 µl em cada alvéolo. Dos padrões constituem-se duplicados; das amostras, triplicados. Incuba-se de um dia para o outro a 4 °C num agitador.

3. Lavam-se as placas 5 vezes com tampão de lavagem (*).

4. Diluem-se em tampão de lavagem HRP (peroxidase de raiz-forte) acoplado a uma cadeia de dextrano (por exemplo da AMDEX A/S, Dinamarca) e anticorpos conjugados. A diluição a utilizar depende do lote e da idade. Introduzem-se 150 µl em cada alvéolo e incubam-se as placas num agitador, durante uma hora, à temperatura ambiente.

5. Lavam-se as placas 5 vezes com tampão de lavagem (*) e limpa-se cuidadosamente o fundo das placas com etanol.

6. Introduz-se um volume de 150 µl de TMB plus (***) em cada alvéolo. Protegem-se as placas da luz com folha de alumínio e acompanha-se a evolução da cor num agitador.

7. Uma vez obtida a curva de calibração, para-se a atividade enzimática adicionando a cada alvéolo 150 µl de H_2SO_4 0,2 M.

8. Mede-se a absorvância a 450 nm (por exemplo num leitor de placas Thermomax da Molecular Devices). Analisam-se os dados com o *software* associado (Softmax, por exemplo).

(*) Tampão de lavagem:

Tampão fosfato (PBS) de reserva (****)	500,0	ml
Albumina sérica bovina (BSA)	5,0	g
Tween 20	5,0	ml

Ajusta-se o pH a 7,3 e completa-se o volume até 5 litros com água Millipore. Guarda-se a 4 °C.

(**) Tampão de diluição:

Tampão fosfato (PBS) de reserva****	100,0	ml
Albumina sérica bovina (BSA)	3,0	g
Tween 20	1,0	ml

Ajusta-se o pH a 7,3 e completa-se o volume até um litro com água Millipore. Guarda-se a 4 °C.

(***) TMB plus é um substrato pronto a utilizar produzido pela KemEnTec (Dinamarca). É fotossensível. Guarda-se a 4 °C.

([1]) Battelle AP4.6.04 (1,18 mg/ml (AAA)), purificado de acordo com: Denslow, N.D., Chow, M.C., Kroll, K.J., Green, L. (1999). Vitellogenin as a biomarker of exposure for estrogen or estrogen mimics. Ecotoxicology, 8:385-398.

▼**M6**

(****) Tampão fosfato (PBS) de reserva

NaCl	160,0	g
KH_2PO_4	4,0	g
$Na_2HPO_4 \times 2H_2O$	26,6	g
KCl	4,0	g

Ajusta-se o pH a 6,8 e completa-se o volume até 2 litros com água Millipore. Guarda-se à temperatura ambiente.

▼M6

Apêndice 7

Orientações relativas à preparação de cortes de tecido para determinação do sexo e classificação do estádio de desenvolvimento das gónadas

Este apêndice visa descrever os procedimentos que precedem a avaliação dos cortes histológicos. Podem ser aplicados outros protocolos, desde que o sexo determinado e a classificação do estádio de desenvolvimento das gónadas sejam idênticos.

Salvo algumas exceções, estes protocolos são iguais para o peixe-do-arroz-japonês e o peixe-zebra.

Eutanásia, necropsia e fixação dos tecidos

Objetivos:

1. Eutanásia sem sofrimento dos peixes.

2. Obtenção dos pesos corporais e medições necessários.

3. Avaliação dos caracteres sexuais secundários.

4. Dissecação de tecidos para análise da vitelogenina.

5. Fixação das gónadas.

Procedimentos:

1. Eutanasiam-se os peixes imediatamente antes da necropsia. Por conseguinte, a menos que estejam disponíveis muitos prossetores, não se eutanasiam muitos peixes simultaneamente.

2. Recorrendo a um pequeno coador de rede, retira-se um peixe da cuba de ensaio e transfere-se num recipiente de transporte para a bancada onde vai realizar-se a necropsia.

3. Introduz-se o peixe na solução eutanasiante. Retira-se o peixe desta solução quando deixar de respirar e de reagir a estímulos externos.

4. Determina-se o peso húmido do peixe.

5. Para a preparação dos tecidos para análise da vitelogenina, pode colocar-se o peixe numa placa de cortiça na plataforma destinada a esse fim de um microscópio de dissecação.

   a) No caso do peixe-zebra, corta-se a cabeça imediatamente atrás da barbatana peitoral e a cauda imediatamente atrás da barbatana dorsal.

   b) No caso do peixe-do-arroz-japonês, abre-se o abdómen por meio de uma incisão efetuada cuidadosamente ao longo da linha média ventral, entre a cintura escapular e um ponto imediatamente anterior ao ânus. Remove-se cuidadosamente o fígado com uma pequena pinça e uma pequena tesoura.

6. Colocam-se os espécimes para análise da vitelogenina em tubos de Eppendorf e congela-se imediatamente em azoto líquido.

7. Coloca-se a carcaça, incluindo as gónadas, numa caixinha de plástico para tecidos previamente rotulada, após o que se mergulha em fixador de Davidson ou de Bouin. O volume de fixador deve ser, pelo menos, dez vezes maior do que o volume aproximado dos tecidos. Agita-se suavemente o recipiente do fixador durante cinco segundos, para soltar as bolhas de ar da caixinha de tecidos.

8. a) Deixam-se os tecidos no fixador de Davidson de um dia para o outro, após o que se transferem para recipientes individuais contendo formol a 10 % tamponado a pH neutro. Agitam-se suavemente os recipientes com as caixinhas durante cinco segundos, para que o formol nelas penetre adequadamente.

▼M6

b) No caso do fixador de Bouin, deixam-se os tecidos mergulhados no fixador durante 24 horas, após o que se transferem as caixinhas para etanol a 70 %.

Tratamento dos tecidos

Objetivos:

1. Desidratação dos tecidos para boa penetração da parafina.

2. Impregnação dos tecidos com parafina, para manter a integridade dos tecidos e criar uma superfície firme para a microtomia.

Procedimentos:

3. Retiram-se as caixinhas de tecidos rotuladas do formol ou do etanol e colocam-se no(s) cesto(s) de tratamento. Introduz(em)-se o(s) cesto(s) no aparelho de tratamento dos tecidos.

4. Escolhe-se o programa de tratamento.

5. Quando o aparelho de tratamento dos tecidos terminar o ciclo de tratamento, o(s) cesto(s) pode(m) ser transferido(s) para a bancada de embebimento.

Embebimento

Objetivo:

Orientação adequada dos espécimes em parafina sólida para realização da microtomia.

Procedimentos:

1. Retira(m)-se o(s) cesto(s) das caixinhas de tecidos do aparelho de tratamento e mergulha(m)-se no compartimento frontal, cheio de parafina, da consola térmica da unidade de embebimento, ou introduzem-se as caixinhas num aquecedor de parafina autónomo.

2. Retira-se a primeira caixinha a embeber do compartimento frontal da consola térmica ou do aquecedor de parafina. Retira-se e descarta-se a tampa da caixinha e confronta-se o rótulo da caixinha com os registos dos peixes, a fim de resolver eventuais discrepâncias antes do embebimento.

3. Seleciona-se um molde de embebimento de dimensões adequadas.

4. Coloca-se o molde junto do bico da consola de distribuição e enche-se o molde com parafina fundida.

5. Retira-se o espécime da caixinha e introduz-se o espécime na parafina fundida do molde. Repete-se este procedimento com 4 a 8 espécimes em cada molde cheio de parafina. Marca-se a posição dos peixes, colocando o peixe n.º 1 a 180.º relativamente aos peixes 2 a 4/8.

6. Acrescenta-se parafina, para cobrir os espécimes.

7. Coloca-se o molde, com a base da caixinha, na placa fria da consola criogénica.

8. Uma vez solidificada a parafina, retira-se o bloco (isto é, a parafina endurecida contendo os tecidos e a base da caixinha) do molde.

Microtomia

Objetivo:

Obtenção e montagem de cortes histológicos para serem corados.

Procedimentos:

1. Realiza-se do seguinte modo a primeira fase da microtomia (faceado):

   a) Coloca-se o bloco de parafina no porta-blocos do micrótomo.

   b) Faz-se avançar o porta-blocos girando a roda do micrótomo e efetuam-se cortes espessos na superfície da parafina do bloco, até a lâmina atingir aos tecidos embebidos.

▼M6

c) Regula-se a espessura de corte do micrótomo entre 3 e 5 micra. Faz-se avançar o porta-blocos e efetuam-se vários cortes no bloco, para eliminar os artefactos eventualmente criados na superfície de corte dos tecidos durante o desbaste grosseiro.

d) Retira-se o bloco do porta-blocos e coloca-se o bloco em gelo, virado para baixo, para pôr os tecidos em contacto com gelo.

2. A fase seguinte da microtomia compreende o corte final e a montagem dos cortes de tecido nas lâminas. Procede-se do seguinte modo:

a) Se o bloco tiver sido colocado em gelo, retira-se o bloco do gelo e recoloca-se no porta-blocos do micrótomo.

b) Regula-se a espessura de corte do micrótomo entre 3 e 5 micra e faz-se avançar o porta-blocos girando a roda do micrótomo. Vai-se cortando o bloco até obter uma fita que contenha, pelo menos, um corte aceitável que inclua as gónadas. (Se necessário, durante o corte do bloco, pode retirar-se este do porta-blocos e colocar-se o bloco em gelo, para pôr novamente os tecidos em contacto com gelo, recolocando-se depois o bloco no porta-blocos.)

c) Colocam-se os cortes a flutuar à superfície de um banho de água, para os aplanar. Deve procurar obter-se pelo menos um corte sem rugas e sem bolhas de ar aprisionadas por debaixo dele.

d) Imerge-se uma lâmina de microscópio por debaixo do melhor corte e retira-se este da água com a ajuda da lâmina. Este processo designa-se por montagem do corte na lâmina.

e) Preparam-se três cortes por conjunto de peixes. Após o primeiro corte, efetuam-se o segundo e o terceiro com intervalos de 50 micra. Se os peixes (com as gónadas) não estiverem embebidos no mesmo nível de corte, é necessário efetuar mais cortes, para obter, pelo menos, seis cortes, com gónadas, de cada peixe.

f) Utilizando uma caneta marcadora, escreve-se em cada lâmina o bloco de que provém.

g) Coloca-se a lâmina num suporte de coloração.

h) Retira-se o bloco do porta-blocos e guarda-se voltado para baixo.

Coloração, cobertura com lamelas e identificação das lâminas

Objetivos:

— Coloração dos cortes para o exame histopatológico.

— Confinamento permanente dos tecidos montados e corados.

— Identificação duradoura dos cortes corados, de modo a garantir perfeita rastreabilidade.

Procedimentos:

1. Coloração

a) Antes da coloração, secam-se as lâminas ao ar de um dia para o outro.

b) Coram-se os cortes com hematoxilina-eosina.

2. Cobertura com lamelas

a) As lamelas de cobertura podem ser aplicadas manualmente ou automaticamente.

b) Mergulha-se a lâmina em xileno ou em Tissue-Clear® e sacode-se cuidadosamente o excesso de xileno ou Tissue-Clear® da lâmina.

▼**M6**

c) Aplica-se cerca de 0,1 ml de meio de montagem junto da extremidade da lâmina oposta à extremidade esmerilada, ou sobre a lamela de cobertura.

d) Inclinando ligeiramente a lamela relativamente à horizontal, aplica-se a lamela à lâmina.

3. Identificação

a) Elementos identificativos a figurar em cada lâmina:

i. Nome do laboratório;

ii. Espécie;

iii. Número do espécime / Número da lâmina;

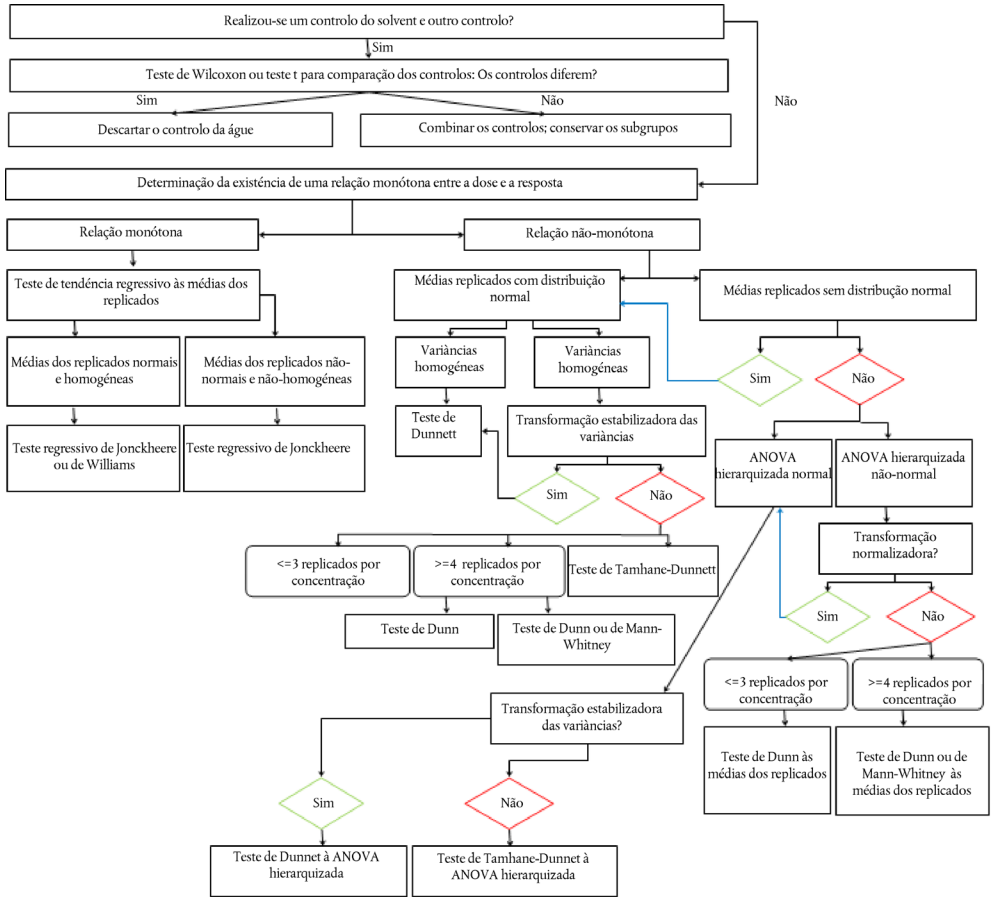
iv. Produto químico / Grupo de exposição;

v. Data.

▼M6

Apêndice 8

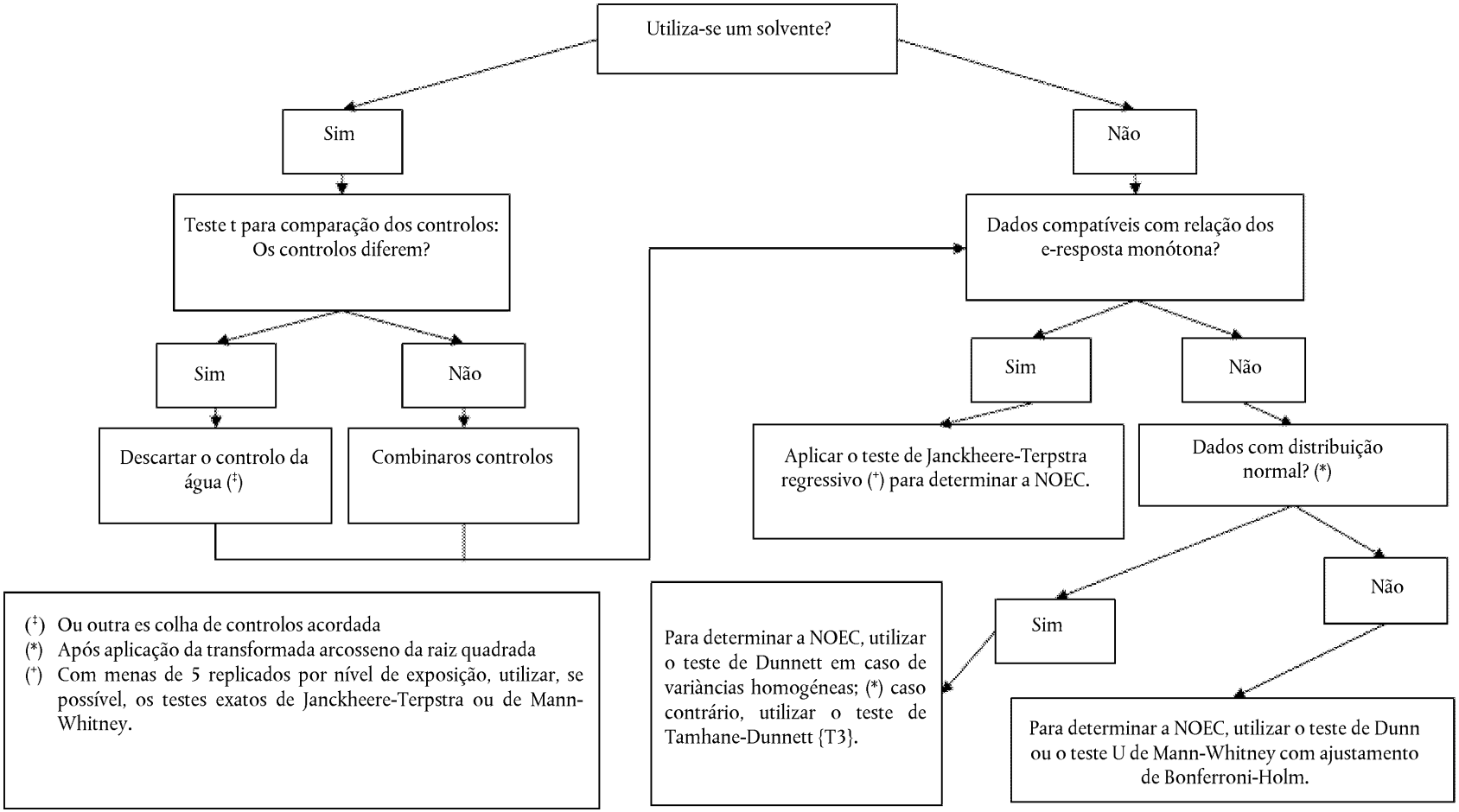
Fluxograma estatístico para a análise da vitelogenina



02008R0440 — PT — 16.10.2019 — 008.001 — 2318

▼M6

Fluxograma estatístico para a determinação do rácio sexual



▼M6

Apêndice 9

Orientações relativas à colheita de amostras de tecidos para determinação do sexo genético e à determinação do sexo genético pelo método PCR

Colheita de amostras, preparação e conservação de tecidos antes da determinação do sexo genético pelo método PCR no peixe-do-arroz (elaborado pelo laboratório dos organismos aquáticos da Bayer CropScience AG)

1. Utilizando uma tesoura fina, corta-se a barbatana anal ou a barbatana dorsal de cada peixe e coloca-se a barbatana num tubo com 100 µl de tampão de extração 1 (ver adiante a preparação deste tampão). Após cada peixe, lava-se a tesoura num copo de água destilada e seca-se com papel absorvente.

2. Homogeneízam-se os tecidos da barbatana com um pilão de teflon para microtubos, de modo a obter a lise das células. A fim de evitar contaminações, utiliza-se um pilão novo para cada tubo. Deixam-se os pilões numa solução 0,5 M de NaOH de um dia para o outro; lavam-se durante 5 minutos com água destilada e guardam-se em etanol até à utilização, ou esterilizam-se em autoclave antes de serem utilizados.

3. Os tecidos de barbatana também podem ser conservados em neve carbónica, sem o tampão de extração 1, e, em seguida, ser refrigerados a – 80 °C, para impedir a degeneração do ADN. Porém, a extração do ADN resulta melhor se for imediata (ver acima o modo de proceder). Antes de introduzir o tampão nos tubos, descongelam-se sobre gelo as amostras conservadas a – 80 °C.

4. Depois da homogeneização, colocam-se os tubos num banho de água e mantêm-se a 100 °C durante 15 minutos.

5. Em seguida, pipetam-se para cada tubo 100 µl do tampão de extração 2 (ver adiante a preparação deste tampão). Conservam-se as amostras à temperatura ambiente durante 15 minutos, agitando-as suavemente, de vez em quando, à mão.

6. Colocam-se de novo os tubos no banho de água e mantêm-se a 100 °C durante mais 15 minutos.

7. Em seguida, conservam-se os tubos a – 20 °C até ao prosseguimento das análises.

Preparação dos tampões

Tampão 1 para PCR:

500 mg de *N*-Lauroilsarcosina (por exemplo Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha);

2 ml de solução 5 M de NaCl;

100 ml de água destilada;

→ autoclave.

Tampão 2 para PCR:

20 g de Chelex (por exemplo da Biorad, Munique, Alemanha);

Hidratar em 100 ml de água destilada;

→ autoclave.

Determinação do sexo genético pelo método PCR no peixe-do-arroz (elaborado pelo laboratório dos organismos aquáticos da Bayer CropScience AG e pelo *Biozentrum* da Universidade de Würzburg)

Descongelam-se sobre gelo os tubos preparados e congelados como se descreveu. Em seguida, centrifugam-se numa centrifugadora de Eppendorf (30 s à velocidade máxima, à temperatura ambiente). Utiliza-se no método PCR o sobrenadante límpido separado do precipitado. É indispensável evitar qualquer participação do Chelex (por transferência do precipitado, onde está presente) na reação PCR, dado que isso interferiria na atividade da Taq-polimerase. Pode utilizar-se imediatamente o sobrenadante ou pode-se guardá-lo congelado (a – 20 °C) e descongelá-lo e recongelá-lo várias vezes, sem impacto negativo no ADN nas análises ulteriores.

▼**M6**

1. *Preparação da designada «mistura reacional» (25 µl por amostra):*

	Volume	Concentração final
ADN modelo	0,5 µl-2 µl	
Tampão 10x para PCR, com $MgCl_2$	2,5 µl	1x
Nucleótidos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP)	4µl (5 mM)	200 µM
Iniciador direto (10 µM) (ver os pontos 3 a 5 *infra*)	0,5 µl	200 nM
Iniciador inverso (10 µM) (ver os pontos 3 a 5 *infra*)	0,5 µl	200 nM
DMSO	1,25 µl	5 %
Água para PCR	completar o volume até 25 µl	
Taq-E polimerase	0,3 µl	1,5 U
Tampão 10x para PCR, com $MgCl_2$: 670 mM de Tris/HCl (pH 8,8 a 25 °C), 160 mM de $(NH_4)_2SO_4$, 25 mM de $MgCl_2$, 0,1 % de Tween 20.		

São necessários para cada PCR (ver os pontos 3 a 5 *infra*) o iniciador especial, constituído por uma nova combinação de «mistura reacional», e a quantidade de ADN modelo adequada a cada amostra (ver acima). Pipetam-se os volumes correspondentes para tubos novos. Em seguida, tapam-se os tubos, agitam-se (cerca de 10 s) e centrifugam-se (10 s à temperatura ambiente), após o que pode dar-se início aos programas PCR. Utilizam-se ainda em cada programa PCR um controlo positivo (uma amostra de ADN de atividade conhecida e com resultados claros) e um controlo negativo (1 µl de água destilada).

2. *Preparação do gel de agarose a 1 % — durante a execução dos programas PCR:*

— Dissolvem-se 3 g de agarose em 300 ml de tampão TAE 1 × (gel de agarose a 1 %).

— Leva-se esta solução à ebulição num forno de micro-ondas (2 a 3 minutos).

— Transfere-se a solução quente para um molde especial colocado sobre gelo.

— Após cerca de 20 minutos, o gel de agarose está pronto a utilizar.

— Guarda-se o gel de agarose em tampão TAE 1 × até ao final dos programas PCR.

3. *Programa PCR para a actina:*

Esta reação PCR visa demonstrar que o ADN da amostra não está danificado.

— Iniciador especial:

«Mact1(superior/direto)» → TTC AAC AGC CCT GCC ATG TA

«Mact2(inferior/inverso)» → GCA GCT CAT AGC TCT TCT CCA GGG AG

— Programa:

5 minutos a 95 °C

Ciclo (35 vezes):

Desnaturação → 45 s a 95 °C

Hibridização → 45 s a 56 °C

Extensão → 1 minuto a 68 °C

15 minutos a 68 °C

▼M6

4. *Programa PCR para os genes X e Y:*

Neste programa PCR, utilizam-se as amostras com ADN intacto para detetar os genes X e Y. Após coloração e eletroforese em gel, o ADN masculino evidencia uma banda dupla e o ADN feminino uma banda singela. Inclui-se neste programa um controlo positivo masculino (amostra XY) e um controlo positivo feminino (amostra XX).

— Iniciador especial:

«PG 17.5» (superior/direto) → CCG GGT GCC CAA GTG CTC CCG CTG

«PG 17.6» (inferior/indireto) → GAT CGT CCC TCC ACA GAG AAG AGA

— Programa:

5 minutos a 95 °C

Ciclo (40 vezes):

Desnaturação	→ 45 s a 95 °C
Hibridização	→ 45 s a 55 °C
Extensão	→ 1 minuto e 30 s a 68 °C

15 minutos a 68 °C

5. *Programa PCR para o gene Y utilizado como controlo do programa PCR para os genes X e Y:*

Este programa PCR serve para verificar os resultados do «programa PCR para os genes X e Y». Após coloração e eletroforese em gel, as amostras «masculinas» evidenciam uma banda singela e as amostras «femininas» nenhuma.

— Iniciador especial:

«DMTYa (superior/direto)» → GGC CGG GTC CCC GGG TG

«DMTYd (inferior/indireto)» → TTT GGG TGA ACT CAC ATG G

— Programa:

5 minutos a 95 °C

Ciclo (40 vezes):

Desnaturação	→ 45 s a 95 °C
Hibridização	→ 45 s a 56 °C
Extensão	→ 1 minuto a 68 °C

15 minutos a 68 °C

6. *Coloração das amostras para o método PCR:*

Solução de coloração:

50 % de glicerol

100 mM de EDTA

1 % de SDS

0,25 % de azul de bromofenol

0,25 % de xilenocianol

Pipeta-se 1 µl da solução corante para cada tubo.

7. *Eletroforese em gel:*

— Transfere-se o gel de agarose a 1 % preparado para uma tina de eletroforese em gel cheia de tampão TAE 1 ×.

— Pipetam-se 10 a 15 µl de cada amostra para PCR corada para a fenda correspondente do gel de agarose.

— Pipetam-se 5 a 15 µl de escada de 1 kb (Invitrogen) para outra fenda no gel.

— Inicia-se a eletroforese, aplicando 200 V.

— Termina-se a eletroforese após 30 a 45 minutos.

▼**M6**

8. *Determinação das bandas:*

— Lava-se o gel de agarose com água destilada.

— Mergulha-se o gel de agarose em brometo de etídio durante 15 a 30 minutos.

— Em seguida, fotografa-se o gel de agarose numa caixa de luz ultravioleta.

— Analisam-se as amostras comparando-as com a banda ou bandas de controlo positivo e com a escada de ADN.

▼M6

Apêndice 10

Orientações relativas à colheita de amostras de tecidos no esgana-gata para determinação do sexo genético pelo método PCR

Colheita de amostras de tecidos e extração do ADN

Pode extrair-se o ADN utilizando diversos reagentes comercializados e um sistema de extração manual ou automático. Descreve-se a seguir o protocolo utilizado no laboratório de Weymouth do Cefas, complementado por métodos alternativos em alguns casos.

1. Utilizando uma tesoura fina, corta-se em cada peixe um pequeno pedaço de tecido (10-20 mg) da zona dorsal lateral, após remoção da cabeça e da cauda para análise da vitelogenina,. Transfere-se o tecido para um tubo e coloca-se o tubo em azoto líquido (para armazenagem a – 80 °C) ou enche-se o tubo com etanol a 70 % (para transporte e subsequente conservação a 4 °C). Após cada peixe, limpa-se a tesoura, primeiro em etanol a 70 % e depois em água destilada, secando-se em seguida com papel absorvente.

2. Por meio de aspiração, remove-se o etanol eventualmente presente e, em seguida, digere-se o tecido de um dia para o outro com proteinase K em 400 µl de tampão ATL (Qiagen). Transfere-se uma alíquota (200 µl) do produto da digestão para um bloco S de 96 alvéolos da Qiagen e extrai-se o ADN para 96 alvéolos utilizando o sistema BioRobot Universal da Qiagen e o *kit* QIamp «Investigator BioRobot». Elui-se o ADN para 50 µl de água isenta de DNase e RNase. Caso se utilizem tecidos duros para extrair o ADN (como um espinho ou uma barbatana peitoral), pode ser necessário homogeneizar a amostra no tampão de lise recorrendo ao sistema FastPrep® de lise de tecidos ou a um sistema equivalente de rotura de tecidos.

   Em alternativa:

   a) Digere-se o tecido de um dia para o outro com proteínase K em 400 µl de tampão de lise G2 da Qiagen e extrai-se o ADN de 200 µl do produto da digestão, utilizando o *kit* EZ-1 «DNA easy tissue» e o biorrobô EZ-1 ou o *minikit* «DNA easy tissue». Elui-se o ADN para 50 µl.

   b) Tratam-se os tecidos com o reagente DNAzol. Em resumo, procede-se à lise das amostras de tecidos em 1 ml de DNAzol, durante 10 minutos, num microtubo de centrifugação de 1,5 ml, e centrifuga-se a 13 000 rpm durante 5 minutos, para remover as partículas eventualmente presentes. Em seguida, transfere-se o produto da lise para novo microtubo de centrifugação de 1,5 ml, contendo 500 µl de etanol a 100 % para biologia molecular, e centrifuga-se a 13 000 rpm, durante 10 minutos, para precipitar o ADN. Remove-se o etanol e substitui-se por 400 µl de etanol a 70 % para biologia molecular, centrifuga-se a 13 000 rpm, durante 5 minutos, e dissolve-se o depósito de ADN com 50 µl de água isenta de DNase e RNase para biologia molecular. Novamente, caso se utilizem tecidos duros (barbatana peitoral), pode ser necessário homogeneizar a amostra no tampão de lise recorrendo ao sistema FastPrep® de lise de tecidos, ou a um sistema equivalente de rotura de tecidos, para extrair o ADN.

3. Guarda-se o ADN a – 20 °C até ser utilizado.

   Nota importante: É necessário utilizar luvas durante estas manipulações.

Análise pelo método da reação em cadeia da polimerase (PCR)

Realizaram-se as amplificações utilizando 2,5 µl do extrato de ADN num volume reacional de 50 µl e recorrendo aos iniciadores do *locus* IDH [conforme descrito em Peichel *et al.* (2004). *Current Biology*, 1:1416-1424]:

Iniciador direto	5' GGG ACG AGC AAG ATT TAT TGG 3'
Iniciador inverso	5' TAT AGT TAG CCA GGA GAT GG 3'

▼M6

Há numerosos fornecedores de reagentes adequados para PCR. O método a seguir descrito é o atualmente utilizado no laboratório de Weymouth do Cefas.

1. *Preparação da designada «mistura reacional» (50 µl por amostra)*

Prepara-se uma mistura reacional como se indica a seguir. Pode preparar-se antecipadamente e guardar-se congelada a – 20 °C até ser utilizada. Deve preparar-se uma quantidade de mistura reacional de reserva suficiente para um controlo negativo (apenas água para biologia molecular).

	Volume (solução de reserva concentrada)/amostra	Concentração final
Tampão reacional 5x Go-Taq®	10 µl	1x
$MgCl_2$	5 µl (25 mM)	2,5 mM
Nucleótidos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP)	0,5 µl (25 mM cada um)	250 µM cada um
Iniciador direto	0,5 µl (0,1 nmol/µl)	2,0 µM
Iniciador inverso	0,5 µl (0,1 nmol/µl)	2,0 µM
Água para biologia molecular	30,75 µl	
Polimerase GoTaq	0,25 µl	1,25 U

— Transferem-se 47,5 µl para um tubo de parede fina de 0,5 ml para PCR, rotulado.

— Adicionam-se 2,5 µl do ADN purificado para o tubo convenientemente identificado. Repete-se esta operação para todas as amostras e o controlo negativo.

— Constitui-se uma sobrecamada em cada tubo adicionando 2 gotas de óleo mineral. Em alternativa, pode utilizar-se um termociclador com tampa aquecida.

— Fecham-se as tampas.

— Desnaturaram-se as amostras num termociclador Peltier PTC-225 a 94 ± 2 °C durante 5 minutos, seguindo-se 39 ciclos de 94 ± 2 °C durante 1 minuto, 55 ± 2 °C durante 1 minuto, 72 ± 2 °C durante 1 minuto e um prolongamento final de 72 ± 2 °C durante 10 minutos.

2. *Preparação do gel de agarose (2 %)*

Normalmente, procede-se à resolução dos produtos da PCR num gel de agarose a 20 % contendo brometo de etídio.

Também podem ser utilizados sistemas de eletroforese capilar.

— Pesam-se 2 g de agarose e adicionam-se a 100 ml de tampão TAE 1 ×.

— Aquece-se num forno de micro-ondas (2 a 3 minutos) para dissolver a agarose.

— Adicionam-se duas gotas de brometo de etídio, para obter a concentração final de 0,5 µg/ml.

— Transfere-se a solução quente para o molde do gel.

— Aguarda-se que o gel endureça.

3. *Eletroforese em gel*

— Transfere-se o gel de agarose para o equipamento de eletroforese e mergulha-se no tampão TAE 1 ×.

— Transferem-se 20 µl de todas as amostras para alvéolos separados e um marcador de peso molecular (escada de ADN 100 bp da Promega) para um alvéolo livre.

— Realiza-se a eletroforese a 120 V durante 30 a 45 minutos.

▼**M6**

4. *Visualização dos produtos da amplificação*

Caso tenha sido incorporado brometo de etídio no gel de agarose como se referiu, visualizam-se os produtos de ADN sob luz ultravioleta. Em alternativa, procede-se à coloração do gel antes da visualização, cobrindo-o durante 30 minutos com uma solução aquosa diluída de brometo de etídio (0,5 μg/ml).

▼M6

Apêndice 11

Orientações relativas à fertilização artificial no Esgana-Gata

Este apêndice descreve o método de obtenção de ovos fertilizados de esgana-gata para serem utilizados no Ensaio de Desenvolvimento Sexual em Peixes.

Procedimento

Obtenção de esperma

1. Eutanasia-se um macho com boas cores da população pretendida.

2. Dissecam-se os testículos de cada um dos lados do peixe. Os testículos são, geralmente, estruturas muito pigmentadas em forma de bastonete, facilmente identificáveis na linha média lateral do corpo. Escolhe-se um dos seguintes métodos:

3. Com uma tesoura fina, efetua-se de uma só vez uma incisão de 1 a 1,5 cm a cerca de 45 °C, com início na cloaca.

4. Utiliza-se um bisturi para efetuar uma pequena incisão lateral no peixe, ligeiramente posterior à pélvis e em posição ligeiramente ventral em relação às placas laterais.

5. Retiram-se os testículos com uma pinça fina e colocam-se numa placa de Petri.

6. Cobre-se cada testículo com 100 µl de **solução final de Hank** [1] preparada de fresco.

7. Utilizando uma lâmina de barbear ou um bisturi, cortam-se os testículos em pequenos cubos. Esta operação provoca a libertação de esperma e confere à solução de Hank um aspeto leitoso.

8. Pipeta-se o fluido que contém o esperma para um tubo, procurando não transferir fragmentos dos testículos nesta operação.

9. Transferem-se para o tubo 800 µl de solução final de Hank e mistura-se bem.

10. Se necessário, pode conservar-se o peixe fixando-o com etanol a 100 % ou com outro fixador. Este aspeto é especialmente importante se o estudo visa associar o progenitor às progenituras.

Nota importante: *Embora a maior parte das soluções de reserva possam ser preparadas antecipadamente, a* ***solução 5*** *e a* ***solução final*** *devem ser preparadas no próprio dia da utilização.*

Solução de reserva 1	
NaCl	8,00 g
KCl	0,40 g
Água destilada	100 ml
Solução de reserva 2	
Na_2HPO_4 (anidro)	0,358 g
KH_2PO_4	0,60 g
Água destilada	100 ml
Solução de reserva 3	
$CaCl_2$	0,72 g
Água destilada	50 ml

[1] Solução salina tampão de Hank:

Esta solução é necessária para conservar o esperma durante os preparativos para a fertilização.

▼M6

Solução de reserva 4

$MgSO_4 \times 7H_2O$	1,23 g
Água destilada	50 ml

Solução de reserva 5 (preparada de fresco)

$NaHCO_3$	0,35 g
Água destilada	10 ml

Nota: Caso o laboratório já disponha dos sais indicados, mas com teor de água diferente (por exemplo, com duas moléculas de água de hidratação em vez de sais anidros), esses sais não deixam de poder ser utilizados; porém, é necessário ajustar primeiro o peso com base no peso molecular.

Prepara-se a solução final de Hank do seguinte modo:

Solução de reserva 1	1,0 ml
Solução de reserva 2	0,1 ml
Solução de reserva 3	0,1 ml
Água destilada	8,6 ml
Solução de reserva 4	0,1 ml
Solução de reserva 5	0,1 ml

Misturar bem antes de utilizar.

Fertilização

1. Identificam-se fêmeas grávidas grandes na população pretendida. As fêmeas só estão prontas para serem espremidas quando forem visíveis ovos protuberantes na cloaca. As fêmeas nessa situação apresentam a postura característica de cabeça para cima.

2. Passa-se suavemente com um dedo ao longo do peixe, lateralmente no sentido da cauda, para facilitar a expulsão de um saco de ovos para uma placa de Petri fresca. Repete-se do outro lado e repõe-se o peixe do aquário.

3. Para espalhar os ovos, pode utilizar-se um pincel fino de modo a formar uma monocamada. É importante propiciar a exposição ao esperma do máximo número de ovos possível, pelo que é vantajoso maximizar a superfície dos ovos. Nota importante: Os ovos devem ser mantidos húmidos por contacto com um tecido humedecido (não devem entrar em contacto direto com água, pois isso poderia provocar o endurecimento prematuro do córion, inviabilizando a fertilização). É grande a diversidade do número de ovos que cada fêmea pode produzir, mas, em média, podem ser facilmente obtidos cerca de 150 de uma fêmea grávida.

4. Utilizando o pincel, espalham-se uniformemente 25 µl de esperma em mistura de Hank sobre toda a superfície dos ovos. Uma vez iniciada a fertilização, os ovos endurecem e mudam de cor rapidamente (um minuto). Se o número estimado de ovos exceder 150, repete-se esta operação. Se os ovos não tiverem endurecido ao fim de um minuto, adiciona-se um pouco mais de esperma. Nota importante: A adição de mais esperma não faz necessariamente aumentar a taxa de fertilização.

5. Deixam-se os ovos e a solução de esperma interagir durante, pelo menos, 15 minutos; colocam-se os ovos fertilizados no aquário de exposição antes de transcorridas 1,5 horas após a fertilização.

6. Repete-se a operação com outra fêmea até se colher o número pretendido de ovos.

7. Reservam-se alguns dos últimos ovos, que se fixam com solução a 10 % de ácido acético.

▼M6

Contagem dos ovos e distribuição dos ovos pelos aquários de exposição

1. Para evitar distorções de cariz genético, distribuem-se os ovos uniformemente pelos níveis de exposição. Utilizando um instrumento sem pontas nem gumes (por exemplo uma pinça de entomologia de lâminas largas ou uma ansa de inoculação), divide-se cada lote de ovos fertilizados em grupos com o mesmo número de ovos (tantos grupos quantos os níveis de exposição). Caso se pretenda ter 4 replicados por nível de exposição, cada um dos quais com 20 ovos, será necessário introduzir 80 ovos em cada aquário de exposição. Nota importante: Até se ter a certeza de obter taxas de fertilização de 100 %, é aconselhável adicionar um suplemento de 20 % (ou seja, 96 ovos por nível de exposição).

2. Os ovos de esgana-gata são muito propensos a infeções fúngicas fora do ninho protegido pelo macho. Por esse motivo, é fundamental tratar os ovos com azul de metileno nos primeiros dias do ensaio. Prepara-se uma solução de reserva de 1 miligrama de azul de metileno por mililitro e adiciona-se a cada aquário de exposição o volume necessário para obter uma concentração máxima final de 2,125 mg/l. Nota importante: Depois da eclosão, os esgana-gatas não devem ser expostos ao azul de metileno, pelo que, a partir do sexto dia, o sistema não deve conter azul de metileno.

3. Examinam-se os ovos diariamente, registando-se como tal os ovos mortos ou não fertilizados. Nota importante: Em nenhum momento, até à eclosão, os ovos podem estar emersos, mesmo por períodos muito curtos.

▼M6

C.42. BIODEGRADABILIDADE NA ÁGUA DO MAR

INTRODUÇÃO GERAL

1. Este método é equivalente ao *Test Guideline* TG 306 (1992) da OCDE. Quando foram elaborados os primeiros métodos de ensaio, desconhecia-se em que medida os resultados dos ensaios de despistagem da biodegradabilidade fácil em água doce, utilizando inóculos de efluentes de depuração ou de lamas ativadas, podiam ser aplicados ao ambiente marinho. Têm sido publicados resultados variáveis sobre esta questão (por exemplo (1)).

2. Muitas águas residuais industriais, com uma diversidade de produtos químicos, atingem o mar por descarga direta ou através de estuários ou de rios, nos quais os tempos de residência são baixos comparativamente ao período necessário para a biodegradação completa de muitos dos produtos químicos nelas presentes. Devido à sensibilização crescente para a necessidade de proteger o ambiente marinho de cargas cada vez maiores de produtos químicos e porque é necessário estimar a concentração provável dos produtos químicos no mar, elaboraram-se métodos de ensaio da biodegradabilidade na água do mar.

3. Os métodos aqui descritos utilizam água do mar natural como fase aquosa e como fonte de microrganismos. Tendo em vista a aproximação aos métodos de determinação da biodegradabilidade fácil na água doce, investigou-se a utilização de água do mar ultrafiltrada e centrifugada, bem como de sedimentos marinhos como inóculos. Estes estudos revelaram-se infrutíferos. Por conseguinte, o meio de ensaio é água do mar natural, previamente tratada para remoção das partículas grosseiras.

4. Para determinar a biodegradabilidade total pelo método do balão agitado, são necessárias concentrações relativamente elevadas da substância em estudo, devido à baixa sensibilidade do método analítico de determinação do carbono orgânico dissolvido (COD). Esta circunstância requer, por sua vez, a adição à água do mar de nutrientes minerais (N e P); caso contrário, as baixas concentrações destes nutrientes limitariam a remoção do carbono orgânico dissolvido. É igualmente necessário adicionar os nutrientes no método do frasco fechado, devido à concentração da substância em estudo adicionada.

5. Nenhum dos dois métodos é, portanto, um ensaio de biodegradabilidade fácil, pois não se adiciona nenhum inóculo aos microrganismos presentes na água do mar. Nenhum dos ensaios simula também o ambiente marinho, pois adicionam-se nutrientes e a concentração da substância em estudo é muito superior à que estaria presente na água do mar. Por estas razões, propõem-se estes métodos na nova subsecção «Biodegradabilidade na água do mar».

APLICAÇÃO

6. Os ensaios são efetuados no caso de as condições de utilização e de eliminação da substância indicarem o caminho do mar e os resultados neles obtidos dão uma primeira indicação da biodegradabilidade na água do mar. Se o resultado for positivo (mais de 70 % de remoção do carbono orgânico dissolvido; mais de 60 % da carência teórica de oxigénio — CTO), pode concluir-se pela existência de um potencial de biodegradação no ambiente marinho. Porém, um resultado negativo não exclui esse potencial, mas aponta para a necessidade de mais estudos, por exemplo reduzindo o mais possível a concentração da substância em estudo.

▼M6

7. Em qualquer dos casos, se for necessário um valor mais definitivo da taxa ou do grau de biodegradação na água do mar num determinado local, terá de se recorrer a métodos mais complexos, mais sofisticados e, consequentemente, mais dispendiosos. Por exemplo, pode efetuar-se um ensaio de simulação utilizando uma concentração da substância em estudo mais próxima da concentração provável desta no ambiente. Também pode utilizar-se água do mar não-enriquecida, sem pré-tratamento, colhida no local em estudo, acompanhando-se a biodegradação primária por meio de uma análise química específica. Para determinar a biodegradabilidade total, são necessárias substâncias marcadas com carbono 14, a fim de se poderem medir as taxas de desaparecimento do carbono 14 orgânico solúvel e de produção de $^{14}CO_2$ a concentrações realistas em termos ambientais.

ESCOLHA DO MÉTODO

8. A escolha do método a utilizar depende de vários fatores, facultando-se o quadro seguinte para facilitar essa escolha. As substâncias cuja hidrossolubilidade seja inferior ao equivalente a cerca de 5 mg de C/litro não podem ser ensaiadas pelo método do balão agitado, mas as substâncias fracamente solúveis podem, em princípio, ser ensaiadas pelo método do frasco fechado.

Quadro:

Vantagens e desvantagens do ensaio do balão agitado e do ensaio do frasco fechado.

MÉTODO	VANTAGENS	DESVANTAGENS
BALÃO AGITADO	— material simples, exceto o analisador de C; — a duração de 60 dias não constitui um problema; — sem interferência da nitrificação; — adaptável a substâncias voláteis.	— necessidade de um analisador de C; — concentração de carbono orgânico dissolvido, eventualmente inibidora, na gama 4-50 mg/l; — difícil determinação de baixas concentrações de carbono orgânico dissolvido na água do mar (efeito dos cloretos); — concentração por vezes elevada de carbono orgânico dissolvido na água do mar.
FRASCO FECHADO	— material simples; — determinação simples do final; — baixa concentração da substância em estudo (2 mg/l), logo menos probabilidade de inibição; — facilmente adaptável a substâncias voláteis.	— pode ser difícil manter os frascos estanques ao ar; — a proliferação de bactérias nas paredes pode falsear os resultados; — possibilidade de valores elevados de absorção de O_2 no branco, especialmente após 28 dias; pode ser ultrapassado envelhecendo a água do mar; — possibilidade de interferência da absorção de O_2 na nitrificação.

MÉTODO DO BALÃO AGITADO

INTRODUÇÃO

1. Este método constitui uma variante para água do mar do Teste de Despiste da OCDE Modificado descrito no capítulo C.4-B deste anexo (2). Foi finalizado no seguimento do estudo interlaboratorial comparativo organizado para a Comissão Europeia pelo Instituto da Qualidade da Água da Dinamarca (3).

2. Tal como sucede relativamente aos resultados do método do frasco fechado para a água do mar, os resultados deste ensaio não devem ser considerados indicadores de biodegradabilidade fácil, destinando-se especificamente a obter informações sobre a biodegradabilidade de substâncias em ambientes marinhos.

▼M6

PRINCÍPIO DO MÉTODO

3. Dissolve-se no meio de ensaio uma quantidade predeterminada da substância em estudo, de modo a obter uma concentração de carbono orgânico dissolvido compreendida entre 5 mg e 40 mg por litro. Se os limites de sensibilidade das análises do carbono orgânico forem melhorados, pode ser vantajoso utilizar concentrações mais baixas da substância em estudo, em especial no caso das substâncias inibidoras. Incuba-se a solução da substância em estudo no meio de ensaio, na obscuridade ou com iluminação difusa, em condições aeróbias, sob agitação e a uma dada temperatura (com variação contida a ± 2 °C), normalmente compreendida entre 15 °C e 20 °C. Se o objetivo do estudo for simular situações ambientais, o ensaio pode estender-se a temperaturas fora deste intervalo normal. A duração máxima recomendada do ensaio é de aproximadamente 60 dias. Acompanha-se a degradação determinando o carbono orgânico dissolvido (degradação total) e, em alguns casos, realizando uma análise específica (degradação primária).

INFORMAÇÕES SOBRE A SUBSTÂNCIA EM ESTUDO

4. Para avaliar se o ensaio é aplicável a uma determinada substância, há que conhecer algumas propriedades da mesma. É necessário conhecer o teor de carbono orgânico da substância, a volatilidade desta não deve dar azo a perdas significativas durante o ensaio e a hidrossolubilidade da substância deve exceder o equivalente a 25-40 mg C/l. Além disso, não deve ser significativa a adsorção da substância em estudo às superfícies de vidro. Para que seja possível interpretar os resultados, é necessário dispor igualmente de informações sobre a pureza ou as proporções relativas dos principais componentes da substância em estudo, especialmente quando os resultados estiverem próximos do limiar de aceitação.

5. Para selecionar as concentrações adequadas para o ensaio, pode ser útil dispor de informações sobre a toxicidade da substância em estudo para as bactérias, determinada, por exemplo, em ensaios de taxa de respiração de curta duração (4), podendo essas informações ser mesmo essenciais para a correta interpretação de valores de biodegradação baixos. Porém, nem sempre estas informações são suficientes para interpretar os resultados dos ensaios de biodegradação, sendo mais adequado o processo descrito no ponto 18.

SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

6. Utilizam-se substâncias de referência adequadas para verificar a atividade microbiana das amostras de água do mar. O benzoato de sódio, o acetato de sódio e a anilina são exemplos de substâncias utilizáveis para este fim. As substâncias de referência devem degradar-se num período relativamente curto; caso contrário, recomenda-se a repetição do ensaio com outra amostra de água do mar.

7. No estudo interlaboratorial comparativo realizado na UE, foram colhidas amostras de água do mar em diversos locais e em diversos períodos do ano (3), tendo a fase de latência (t_L) e o tempo necessário, após a fase de latência, para atingir 50 % de degradação (t_{50}) sido de 1 a 4 dias e de 1 a 7 dias, respetivamente, para o benzoato de sódio. No caso da anilina, o t_L variou entre 0 e 10 dias e o t_{50} entre 1 e 10 dias.

REPRODUTIBILIDADE E SENSIBILIDADE DO MÉTODO

8. A reprodutibilidade do método foi determinada no estudo interlaboratorial comparativo (3). A concentração mínima da substância em estudo que permite utilizar este método com a análise do carbono orgânico dissolvido depende, em grande medida, do limite de deteção da análise do carbono orgânico (presentemente cerca de 0,5 mg C/l) e da concentração de carbono orgânico dissolvido da água do mar utilizada (normalmente 3-5 mg/l, no caso de água do mar colhida ao largo). A concentração de fundo de carbono orgânico dissolvido não deve exceder cerca de 20 % da concentração total de

▼M6

carbono orgânico dissolvido após a adição da substância em estudo. Caso isso não seja exequível, por vezes pode reduzir-se a concentração de fundo de carbono orgânico dissolvido envelhecendo a água do mar antes do ensaio. Se o método for utilizado apenas com uma análise química específica (para determinação da degradação primária), o investigador deve comprovar, fornecendo informações adicionais, se é de esperar degradabilidade total. Estas informações adicionais podem consistir de resultados de outros ensaios, de biodegradabilidade fácil ou intrínseca.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Material e aparelhagem

9. Material corrente de laboratório e:

a) Agitador para balões de Erlenmeyer de 0,5-2 litros de capacidade, com regulação automática de temperatura ou colocado num recinto à temperatura constante de 15 °C a 20 °C, com variação contida a ± 2 °C;

b) Balões de Erlenmeyer de gargalo estreito, de 0,5-2 litros de capacidade;

c) Aparelho de filtração por membrana, ou centrifugadora;

d) Filtros de membrana, com porosidade de 0,2 μm a 0,45 μm;

e) Analisador de carbono;

f) Equipamento para a análise específica (facultativo).

Água do mar

10. Colhe-se uma amostra de água do mar num recipiente cuidadosamente limpo e transporta-se a amostra para o laboratório, de preferência não mais de um a dois dias após a colheita. Durante o transporte, a temperatura da amostra não pode exceder significativamente a temperatura do ensaio. É necessário identificar com precisão o local de colheita da amostra e caracterizá-lo em termos de estado de poluição e de nutrientes presentes. Sobretudo no caso das águas costeiras, esta caracterização deve compreender uma contagem das colónias de microrganismos heterotróficos e a determinação das concentrações de nitratos, amónio e fosfatos dissolvidos.

11. Informações a fornecer relativamente à amostra de água do mar:

— data da colheita;

— profundidade da colheita;

— aspeto da amostra — turva etc.;

— temperatura no momento da colheita;

— salinidade;

— carbono orgânico dissolvido;

— período compreendido entre a colheita e a utilização no ensaio.

12. Caso se determine um teor elevado de carbono orgânico dissolvido na amostra de água do mar (pontos 8), recomenda-se o envelhecimento desta durante cerca de uma semana, antes da utilização. O envelhecimento processa-se por conservação da amostra na obscuridade ou com iluminação difusa, em condições aeróbias, à temperatura do ensaio. Se necessário, mantêm-se condições aeróbias efetuando um arejamento ligeiro. Durante o envelhecimento,

▼M6

diminui o teor da matéria orgânica facilmente degradável. No estudo interlaboratorial comparativo (3), não foi detetada nenhuma diferença de potencial de degradação entre amostras de água do mar envelhecidas e amostras de água do mar colhidas recentemente. Antes de utilizar as amostras, procede-se a um tratamento prévio da água do mar para retirar as partículas grosseiras, por exemplo por filtração através de um filtro de nylon ou de um filtro de papel para filtrações grosseiras (não utilizar filtros de membrana nem filtros GF-C), ou por sedimentação seguida de decantação. O processo utilizado deve ser referido no relatório. O eventual envelhecimento deve preceder o tratamento prévio.

Soluções de reserva de nutrientes minerais

13. Preparam-se as seguintes soluções de reserva, utilizando reagentes da qualidade analítica:

a) Di-hidrogeno-ortofosfato de potássio (KH_2PO_4) 8,50 g

Hidrogeno-ortofosfato de dipotássio (K_2HPO_4) 21,75 g

Hidrogeno-ortofosfato de dissódio di-hidratado ($Na_2HPO_4 \times 2H_2O$) 33,30 g

Cloreto de amónio (NH_4Cl) 0,50 g

Dissolver em água destilada e completar o volume até um litro.

b) Cloreto de cálcio ($CaCl_2$) 27,50 g

Dissolver em água destilada e completar o volume até um litro.

c) Sulfato de magnésio hepta-hidratado ($MgSO_4 \times 7H_2O$) 22,50 g

Dissolver em água destilada e completar o volume até um litro.

d) Cloreto de ferro (III) hexa-hidratado ($FeCl_3 \times 6H_2O$) 0,25 g

Dissolver em água destilada e completar o volume até um litro.

Para evitar a precipitação na solução d) pode adicionar-se uma gota de HCl concentrado ou 0,4 g do sal dissódico do ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) por litro. Caso se forme algum precipitado numa solução de reserva, há que substituí-la por solução fresca.

Preparação do meio a utilizar no ensaio

14. Adiciona-se 1 ml de cada uma das soluções de reserva acima indicadas por litro de água do mar pré-tratada.

Inóculo

15. Não se adiciona nenhum inóculo aos microrganismos já presentes na água do mar. Para determinar (facultativamente) o número de colónias de microrganismos heterotróficos no meio de água do mar ensaiado (e, de preferência, também nas amostras originais de água do mar), efetua-se, por exemplo, uma contagem em placa de ágar marinho. Este procedimento é especialmente desejável no caso das amostras provenientes de locais costeiros ou poluídos. Verifica-se a atividade microbiana heterotrófica na água do mar realizando um ensaio com uma substância de referência.

▼M6

Preparação dos balões

16. Antes de ser utilizado, para evitar contaminações por resíduos de ensaios anteriores, o material de vidro tem de ser escrupulosamente limpo (utilizando, por exemplo, uma solução alcoólica de ácido clorídrico), mas não necessariamente esterilizado, após o que é enxaguado e seco. Os balões também têm de ser limpos antes de serem utilizados pela primeira vez.

17. Utilizam-se simultaneamente balões em duplicado para a avaliação da substância em estudo e um balão para a substância de referência. Para determinação dos brancos analíticos, realiza-se um ensaio em branco, em duplicado, sem a substância em estudo nem a substância de referência. Dissolve-se a substância em estudo no meio de ensaio — é prático adicioná-la recorrendo a uma solução de reserva concentrada — de modo a obter as concentrações iniciais pretendidas, normalmente 5 mg a 40 mg de carbono orgânico dissolvido por litro. Procede-se ao ensaio da substância de referência utilizando, normalmente, uma concentração inicial correspondente a 20 mg de carbono orgânico dissolvido por litro. Caso se utilizem soluções de reserva da substância em estudo e/ou da substância de referência, é importante que a salinidade do meio de água do mar não seja muito alterada.

18. Se forem previsíveis ou não forem de excluir efeitos tóxicos, pode ser aconselhável incluir no ensaio uma experiência, em duplicado, de inibição. Para isso, adicionam-se as substâncias em estudo e de referência a um mesmo recipiente, sendo a concentração desta última normalmente igual à do ensaio de controlo (ou seja, 20 mg de carbono orgânico dissolvido por litro), para permitir comparações.

19. Transferem-se volumes adequados das soluções em estudo para balões de Erlenmeyer (são aceitáveis volumes até metade do volume do balão) e tapa-se cada balão de modo não-hermético (por exemplo com folha de alumínio), a fim de possibilitar permutas gasosas entre os balões e o ar circundante. (Caso se recorra à análise do carbono orgânico dissolvido, é inadequado utilizar tampões de algodão). Colocam-se os recipientes no agitador e agita-se continuamente a baixa velocidade (por exemplo a 100 rpm) ao longo de todo o ensaio. É necessário manter a temperatura constante (15--20 °C, com variação contida a ± 2 °C) e proteger os recipientes da luz, a fim de evitar o crescimento de algas. É igualmente necessário que o ar esteja isento de matérias tóxicas.

Ensaio de controlo físico-químico (facultativo)

20. Se houver suspeitas de degradação abiótica ou de mecanismos de perdas, como hidrólise (problemático apenas no caso de uma análise específica), volatilização ou adsorção, é aconselhável realizar uma experiência de controlo físico-químico. Para o efeito, a fim de suspender a atividade microbiana, pode adicionar-se cloreto de mercúrio (II) ($HgCl_2$) ([1]) (50-100 mg/l) a recipientes que contenham a substância em estudo. Uma diminuição significativa, neste ensaio de controlo físico-químico, do carbono orgânico dissolvido ou da concentração da substância específica indicia mecanismos de remoção abióticos. (Caso se utilize cloreto de mercúrio, é necessário ter presente a possibilidade de interferências ou de envenenamento catalítico na análise do carbono orgânico dissolvido.)

Número de balões

21. Utilizam-se normalmente num ensaio os seguintes balões:

Balões 1 e 2	contêm a substância em estudo (suspensão ensaiada);
Balões 3 e 4	contêm apenas água do mar (branco);
Balão 5	contém a substância de referência (controlo do método);
Balão 6	contém a substância em estudo e a substância de referência (experiência de verificação da toxicidade) — facultativo;
Balão 7	contém a substância em estudo e o agente esterilizante (experiência em meio estéril de verificação de ação abiótica) — facultativo.

([1]) O cloreto de mercúrio (II) ($HgCl_2$) é uma substância muito tóxica, que deve ser manuseada com as precauções adequadas. Os resíduos aquosos que a contenham devem ser eliminados de modo adequado; não devem ser encaminhados para a rede de esgotos.

▼M6

Análise do carbono orgânico dissolvido

22. No decurso do ensaio, colhem-se amostras a intervalos adequados para a análise do carbono orgânico dissolvido (apêndice 1). Colhem-se sempre amostras no início do ensaio (dia 0) e no dia 60. São necessárias pelo menos cinco amostras para descrever a evolução da degradação. Dada a variação das taxas de biodegradação, não é possível estabelecer uma cronologia fixa de colheita de amostras. Determina-se em duplicado o carbono orgânico dissolvido em cada amostra.

Amostras

23. O volume necessário das amostras depende do método analítico (análise específica), do analisador de carbono utilizado e do processo (filtração por membrana ou centrifugação) escolhido para o tratamento prévio das amostras antes da determinação do carbono (pontos 25 e 26). Antes de colher as amostras, é necessário misturar bem o meio de ensaio e dissolver ou suspender quaisquer matérias aderentes às paredes do balão.

24. Filtra-se por membrana ou centrifuga-se cada amostra imediatamente após a colheita. Se necessário, conservam-se as amostras filtradas ou centrifugadas a 2-4 °C por períodos não superiores a 48 horas ou abaixo de – 18 °C por períodos mais longos (caso se saiba que isso não afetará a substância em causa, acidificam-se as amostras a pH 2 antes de serem armazenadas).

25. Os filtros de membrana (0,2-0,45 μm) são adequados se, comprovadamente, não libertarem carbono nem adsorverem a substância durante a filtração (por exemplo membranas filtrantes de policarbonatos). Alguns filtros de membrana estão impregnados de substâncias tensioativas para hidrofilação e podem libertar quantidades consideráveis de carbono dissolvido. Preparam-se esses filtros fervendo-os em água desionizada durante três períodos consecutivos de uma hora cada. Depois de fervidos, guardam-se os filtros em água desionizada. Eliminam-se os primeiros 20 ml do filtrado.

26. A centrifugação das amostras constitui uma alternativa à filtração por membranas. Centrifuga-se a 40 000 $m.s^{-2}$ (~ 4 000 g) durante 15 minutos, de preferência numa centrifugadora refrigerada.

Nota: Aparentemente, a concentrações muito baixas, não é possível diferenciar por centrifugação o carbono orgânico total (TOC) do carbono orgânico dissolvido (DOC), pois ou as bactérias não são todas removidas ou há redissolução de carbono constituinte do plasma bacteriano. A concentrações de ensaio mais elevadas (> 10 mg C por litro), o erro associado à centrifugação parece ser comparativamente pequeno.

Frequência da colheita de amostras

27. Caso as análises sejam realizadas logo após a colheita das amostras, determina-se o momento da próxima colheita de amostras em função do resultado da determinação analítica.

28. Caso as amostras sejam conservadas (ponto 24) para serem analisadas mais tarde, é necessário colher mais amostras do que o mínimo exigido de cinco. Analisam-se primeiro as amostras mais recentes, seguindo-se, uma a uma, a análise de amostras adequadamente escolhidas das mais recentes para as mais antigas, de modo a obter uma boa descrição da curva de biodegradação com um número relativamente pequeno de determinações analíticas. Se não se verificar nenhuma degradação até ao final do ensaio, não é necessário analisar mais nenhuma amostra — nesta eventualidade, o processo retrógrado preconizado permite reduzir consideravelmente os custos analíticos.

▼M6

29. Caso a curva de degradação atinja um patamar antes do dia 60, põe-se fim ao ensaio. Se, ao dia 60, a degradação já tiver manifestamente tido início, mas ainda não tiver atingido um patamar, será necessário prolongar o ensaio.

DADOS E RELATÓRIOS

Tratamento dos resultados

30. Registam-se os resultados analíticos na folha de dados apensa (apêndice 2) e calculam-se os valores de biodegradação para a substância em estudo e a substância de referência por meio da seguinte equação

$$D_t = \left[1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}}\right] \times 100$$

em que:

D_t = degradação em percentagem de remoção de carbono orgânico dissolvido, ou percentagem de remoção da substância específica, no instante t;

C_o = concentração inicial de carbono orgânico dissolvido ou da substância específica, no meio de ensaio;

C_t = concentração de carbono orgânico dissolvido ou da substância específica, no meio de ensaio, no instante t;

$C_{br(0)}$ = concentração inicial de carbono orgânico dissolvido ou da substância específica, no branco;

$C_{br(t)}$ = concentração de carbono orgânico dissolvido ou da substância específica, no branco, no instante t.

31. Indica-se a degradação em percentagem de remoção de carbono orgânico dissolvido (degradação total), ou percentagem de remoção da substância específica (degradação primária), no instante t. Calculam-se as concentrações de carbono orgânico dissolvido com a aproximação de 0,1 mg/l e arredondam-se as médias dos valores de D_t para o valor de percentagem inteiro mais próximo.

32. Traça-se a curva da degradação em função do tempo como se ilustra na figura inserida no item «Validade e interpretação dos resultados». Caso se disponha de dados suficientes, calcula-se a partir da curva a fase de latência (t_L) e o tempo decorrido, após o termo dessa fase, até se atingir 50 % de remoção (t_{50}).

Relatório do ensaio

33. Elementos a constar do relatório do ensaio:

Substância em estudo

— estado físico e propriedades físico-químicas pertinentes;

— dados de identificação.

Condições de realização do ensaio

— localização e descrição do local de colheita das amostras; estado de poluição e nutrientes presentes (contagem de colónias, nitratos, amónio, fosfatos, se for caso disso);

— características da amostra — data e profundidade da colheita, aspeto, temperatura, salinidade, carbono orgânico dissolvido (facultativo), tempo decorrido entre a colheita e a utilização da amostra no ensaio;

▼M6

— método eventualmente utilizado para envelhecer a água do mar;

— método utilizado no tratamento prévio da água do mar (filtração/sedimentação);

— método utilizado na determinação do carbono orgânico dissolvido;

— método utilizado na análise específica (facultativo);

— método utilizado na determinação do número de microrganismos heterotróficos na água do mar (contagem em placas ou outro método) (facultativo);

— outros métodos (facultativos) utilizados para caracterizar a água do mar (medições de ATP etc.).

Resultados

— registo dos resultados analíticos numa folha de dados (apêndice 2);

— traçado da curva de degradação em função do tempo num diagrama que mostre a fase de latência (t_L), o declive e o tempo decorrido, após o termo daquela fase, até se atingir 50 % de remoção (t_{50}). Pode estimar-se graficamente a fase de latência como se ilustra na figura inserida no item «Validade e interpretação dos resultados» ou considerar-se corresponder essa fase ao período decorrido até se atingir 10 % de degradação;

— percentagem de degradação medida após 60 dias ou no final do ensaio.

Discussão dos resultados.

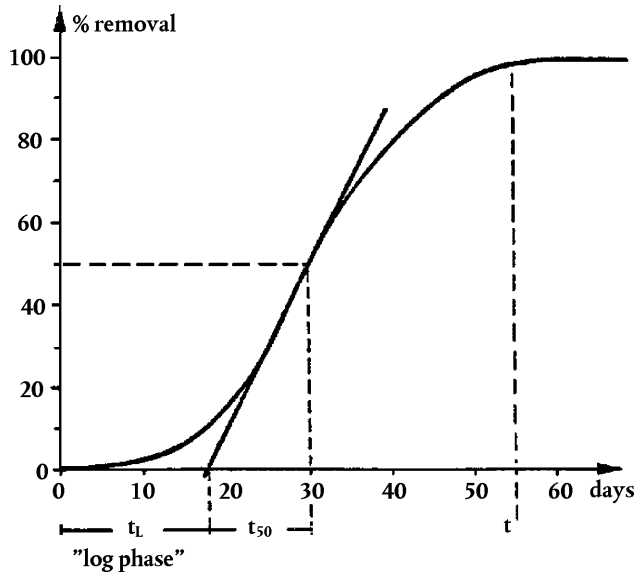
Validade e interpretação dos resultados

34. Os resultados obtidos com as substâncias de referência (por exemplo benzoato de sódio, acetato de sódio ou anilina) devem ser comparáveis aos obtidos no estudo interlaboratorial comparativo (3) (ver o ponto 7 do item «Substâncias de referência»). Se os resultados obtidos com as substâncias de referência forem atípicos, deve repetir-se o ensaio com outra amostra de água do mar. Embora nem sempre seja fácil interpretar os resultados dos ensaios de inibição, devido ao carbono orgânico dissolvido proveniente da substância em estudo, uma diminuição significativa da taxa de remoção do carbono orgânico dissolvido total, comparativamente à experiência de controlo, constitui uma indicação de efeitos tóxicos.

35. Dadas as concentrações relativamente elevadas utilizadas neste ensaio comparativamente à maior parte dos sistemas naturais (e à consequente relação desfavorável entre as concentrações da substância em estudo e das outras fontes de carbono), deve encarar-se este método como um ensaio preliminar destinado a avaliar se uma substância é ou não facilmente biodegradável. Nessa perspetiva, um resultado baixo não significa necessariamente que a substância em estudo não é biodegradável em ambientes marinhos, mas antes que é necessário mais trabalho para tirar conclusões acerca disso.

Apresenta-se na figura seguinte um exemplo de uma experiência de degradação teórica que ilustra um modo de estimar os valores de t_L (duração da «fase de latência») e de t_{50} (tempo decorrido após t_L até se atingir 50 % de remoção).

▼M6



MÉTODO DO FRASCO FECHADO

INTRODUÇÃO

1. Este método constitui uma variante para água do mar do Ensaio em Frasco Fechado (5). Foi finalizado no seguimento do estudo interlaboratorial comparativo organizado para a Comissão Europeia pelo Instituto da Qualidade da Água da Dinamarca (3).

2. Tal como sucede relativamente aos resultados do método do balão agitado para a água do mar, os resultados deste ensaio não devem ser considerados indicadores de biodegradabilidade fácil, destinando-se especificamente a obter informações sobre a biodegradabilidade de substâncias em ambientes marinhos.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

3. Dissolve-se no meio de ensaio uma quantidade predeterminada da substância em estudo, de modo a obter uma concentração desta normalmente compreendida entre 2 mg e 10 mg por litro (pode utilizar-se uma ou mais concentrações). Conserva-se a solução na obscuridade, num frasco cheio fechado, num banho ou numa câmara termostática a uma temperatura compreendida entre 15 °C e 20 °C, com variação contida a ± 1 °C. Se o objetivo do estudo for simular situações ambientais, o ensaio pode estender-se a temperaturas fora deste intervalo normal, desde que se ajuste convenientemente a regulação de temperatura. Acompanha-se o processo de degradação por meio de análises de oxigénio durante 28 dias.

4. O estudo interlaboratorial comparativo revelou que, se o ensaio for prolongado além de 28 dias, na maior parte dos casos não se obtêm informações úteis, devido a fortes interferências. Os valores de carência bioquímica de oxigénio do branco eram excessivamente elevados, provavelmente devido a crescimento nas paredes do recipiente (causado por falta de agitação) e a nitrificação. A duração recomendada é, pois, de 28 dias, mas, se o valor de carência bioquímica de oxigénio do branco se mantiver dentro do limite de 30 % (pontos 15 e 40), pode prolongar-se o ensaio.

INFORMAÇÕES SOBRE A SUBSTÂNCIA EM ESTUDO

5. Para avaliar se o ensaio é aplicável a uma determinada substância, há que conhecer algumas propriedades da mesma. A fim de calcular a carência teórica de oxigénio (ver o apêndice 3), é necessário conhecer a fórmula empírica; caso contrário, determina-se a carência química de oxigénio (CQO) da substância, para servir de valor de referência. O recurso à carência química de oxigénio é menos satisfatório, pois algumas substâncias não se oxidam completamente no ensaio no qual aquela é determinada.

▼M6

6. A solubilidade da substância não deve ser inferior a 2 mg/l, embora, em princípio, possam ensaiar-se substâncias menos solúveis (por exemplo utilizando ultrassons), bem como substâncias voláteis. Para que seja possível interpretar os resultados, é necessário dispor igualmente de informações sobre a pureza ou as proporções relativas dos principais componentes da substância em estudo, especialmente quando os resultados estiverem próximos do limiar de aceitação.

7. Para selecionar as concentrações adequadas para o ensaio, pode ser muito útil dispor de informações sobre a toxicidade da substância em estudo para as bactérias, determinada, por exemplo, em ensaios de respiração de curta duração (4), podendo essas informações ser mesmo essenciais para a correta interpretação de valores de biodegradação baixos. Porém, nem sempre estas informações são suficientes para interpretar os resultados dos ensaios de biodegradação, sendo mais adequado o processo descrito no ponto 27.

SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

8. Utilizam-se substâncias de referência adequadas para verificar a atividade microbiana das amostras de água do mar. A anilina, o acetato de sódio e o benzoato de sódio são exemplos de substâncias utilizáveis para este fim. As substâncias de referência devem degradar-se pelo menos 60 % (da carência teórica de oxigénio) num período relativamente curto; caso contrário, recomenda-se a repetição do ensaio com outra amostra de água do mar.

9. No estudo interlaboratorial comparativo realizado na UE, foram colhidas amostras de água do mar em diversos locais e em diversos períodos do ano, tendo a fase de latência (t_L) e o tempo necessário, após a fase de latência, para atingir 50 % de degradação (t_{50}) sido de 0 a 2 dias e de 1 a 4 dias, respetivamente, para o benzoato de sódio. Para a anilina, os valores de t_L e de t_{50} foram, respetivamente, de 0 a 7 e de 2 a 12 dias.

REPRODUTIBILIDADE

10. A reprodutibilidade dos métodos foi determinada no estudo interlaboratorial comparativo (3).

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Material e aparelhagem

11. Equipamento normal de laboratório e:

a) Frascos de 250 ml a 300 ml para determinação da carência bioquímica de oxigénio ou balões de 250 ml de gargalo estreito, em ambos os casos com tampa de vidro;

b) Vários frascos de 2, 3 e 4 litros graduados em litros, para a preparação da experiência e o enchimento dos frascos para determinação da carência bioquímica de oxigénio;

c) Banho de água ou recinto a temperatura constante para conservação dos frascos a temperatura constante (± 1 °C), ao abrigo da luz;

d) Equipamento para análise do oxigénio dissolvido;

e) Filtros de membrana, com porosidade de 0,2 μm a 0,45 μm (facultativo);

f) Equipamento para a análise específica (facultativo).

Água do mar

12. Colhe-se uma amostra de água do mar num recipiente cuidadosamente limpo e transporta-se a amostra para o laboratório, de preferência não mais de um a dois dias após a colheita. Durante o transporte, a temperatura da amostra não pode exceder significativamente a temperatura do ensaio.

▼M6

13. É necessário identificar com precisão o local de colheita da amostra e caracterizá-lo em termos de estado de poluição e de nutrientes presentes. Sobretudo no caso das águas costeiras e das águas poluídas, esta caracterização deve compreender uma contagem das colónias de microrganismos heterotróficos e a determinação das concentrações de nitratos, amónio e fosfatos dissolvidos.

14. Informações a fornecer relativamente à amostra de água do mar:

— data da colheita;

— profundidade da colheita;

— aspeto da amostra — turva etc.;

— temperatura no momento da colheita;

— salinidade;

— carbono orgânico dissolvido;

— período compreendido entre a colheita e a utilização no ensaio.

15. Se o teor de carbono orgânico dissolvido da amostra for elevado ou a carência bioquímica de oxigénio do branco após 28 dias for previsivelmente superior a 30 % da carência bioquímica de oxigénio das substâncias de referência, recomenda-se que a água do mar seja envelhecida durante uma semana antes de ser utilizada.

16. O envelhecimento da amostra processa-se por conservação desta na obscuridade ou com iluminação difusa, em condições aeróbias, à temperatura do ensaio. Se necessário, mantêm-se condições aeróbias efetuando um arejamento ligeiro. Durante o envelhecimento, diminui o teor da matéria orgânica facilmente degradável. No estudo interlaboratorial comparativo (3), não foi detetada nenhuma diferença de potencial de degradação entre amostras de água do mar envelhecidas e amostras de água do mar colhidas recentemente.

17. Antes de utilizar as amostras, procede-se a um tratamento prévio da água do mar para retirar as partículas grosseiras, por exemplo por filtração através de um filtro de nylon ou de um filtro de papel para filtrações grosseiras (não utilizar filtros de membrana nem filtros GF-C), ou por sedimentação seguida de decantação. O processo utilizado deve ser referido no relatório. O eventual envelhecimento deve preceder o tratamento prévio.

Soluções de reserva de nutrientes minerais

18. Preparam-se as seguintes soluções de reserva, utilizando reagentes da qualidade analítica:

a)	Di-hidrogeno-ortofosfato de potássio (KH_2PO_4)	8,50 g
	Hidrogeno-ortofosfato de dipotássio (K_2HPO_4)	21,75 g
	Hidrogeno-ortofosfato de dissódio di-hidratado ($Na_2HPO_4 \times 2H_2O$)	33,30 g
	Cloreto de amónio (NH_4Cl)	0,50 g
	Dissolver em água destilada e completar o volume até um litro.	
b)	Cloreto de cálcio ($CaCl_2$)	27,50 g
	Dissolver em água destilada e completar o volume até um litro.	
c)	Sulfato de magnésio hepta-hidratado ($MgSO_4 \times 7H_2O$)	22,50 g
	Dissolver em água destilada e completar o volume até um litro.	
d)	Cloreto de ferro (III) hexa-hidratado ($FeCl_3 \times 6H_2O$)	0,25 g
	Dissolver em água destilada e completar o volume até um litro.	

▼M6

Para evitar a precipitação na solução d) pode adicionar-se uma gota de HCl concentrado ou 0,4 g do sal dissódico do ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) por litro. Caso se forme algum precipitado numa solução de reserva, há que substituí-la por solução fresca.

Preparação do meio a utilizar no ensaio

19. Adiciona-se 1 ml de cada uma das soluções de reserva acima indicadas por litro de água do mar pré-tratada. Satura-se o meio de ensaio com ar à temperatura do ensaio efetuando um arejamento durante 20 minutos com ar comprimido limpo. Para efeitos de controlo, determina-se a concentração de oxigénio dissolvido. Pode obter-se a concentração de saturação de oxigénio dissolvido em função da salinidade e da temperatura por leitura no ábaco inserido no apêndice 4 deste método de ensaio.

Inóculo

20. Não se adiciona nenhum inóculo aos microrganismos já presentes na água do mar. Para determinar (facultativamente) o número de colónias de microrganismos heterotróficos no meio de água do mar ensaiado (e, de preferência, também na amostra original de água do mar), efetua-se, por exemplo, uma contagem em placa de ágar marinho. Este procedimento é especialmente desejável no caso das amostras provenientes de locais costeiros ou poluídos. Verifica-se a atividade microbiana heterotrófica na água do mar realizando um ensaio com uma substância de referência.

Preparação dos frascos a utilizar no ensaio

21. As manipulações necessárias, incluindo o envelhecimento e o tratamento prévio da água do mar, são realizadas à temperatura escolhida para o ensaio, entre 15 °C e 20 °C; o material de vidro deve estar limpo, mas não é necessário esterilizá-lo.

22. Preparam-se grupos de frascos para CBO para determinar a carência bioquímica de oxigénio da substância em estudo e da substância de referência em séries experimentais simultâneas. Preparam-se dois frascos para cada determinação, a fim de realizar todas as análises (branco, substância em estudo e substância de referência) em frascos duplicados. Realizam-se as análises, pelo menos, nos dias 0, 5, 15 e 28 (quatro determinações). Para as análises do oxigénio, são necessários $3 \times 2 \times 4 = 24$ frascos para quatro determinações (branco, substância em estudo e substância de referência) e, portanto, cerca de 8 litros de meio de ensaio (para cada concentração da substância em estudo).

23. Preparam-se separadamente soluções da substância em estudo e da substância de referência em frascos grandes de volume suficiente (ponto 11), começando por adicionar a substância em causa, diretamente ou recorrendo a uma solução de reserva concentrada, a frascos parcialmente cheios. Acrescenta-se o meio de ensaio necessário para obter as concentrações finais pretendidas. Caso se utilizem soluções de reserva da substância em estudo e/ou da substância de referência, é importante que a salinidade do meio de água do mar não seja significativamente alterada.

24. Selecionam-se as concentrações da substância em estudo e da substância de referência tendo em atenção os seguintes aspetos:

a) solubilidade do oxigénio dissolvido na água do mar, à temperatura e com a salinidade a que se realiza o ensaio (ver o ábaco do apêndice 4);

b) carência bioquímica de oxigénio do branco de água do mar; e

c) biodegradabilidade esperada da substância em estudo.

▼M6

25. A 15 °C e 20 °C e com 32 partes por mil de salinidade (água oceânica), a solubilidade do oxigénio dissolvido é, respetivamente, de cerca de 8,1 mg/l e de cerca de 7,4 mg/l. Se a água do mar não for envelhecida, o consumo de oxigénio da própria água (respiração do branco) pode atingir 2 mg ou mais de O_2 por litro. Por conseguinte, a fim de que a concentração de oxigénio restante após a oxidação da substância em estudo ainda seja significativa, utiliza-se uma concentração inicial desta de 2 mg/l a 3 mg/l (em função da carência teórica de oxigénio) no caso das substâncias que (como as substâncias de referência) previsivelmente se degradarão completamente nas condições de realização do ensaio. Desde que não ocorram efeitos tóxicos, ensaiam-se as substâncias menos degradáveis a concentrações mais elevadas, até cerca de 10 mg/l. Pode ser útil realizar em paralelo um ensaio com uma concentração baixa da substância em estudo (cerca de 2 mg/l) e um ensaio com uma concentração elevada da mesma (cerca de 10 mg/l).

26. Realiza-se em paralelo um ensaio em branco do oxigénio, em frascos sem a substância em estudo nem a substância de referência.

27. Caso se pretenda determinar efeitos inibidores, prepara-se a seguinte série de soluções em frascos grandes (ver o ponto 13):

    a) concentração de 2 mg por litro de uma substância facilmente degradável, por exemplo uma das substâncias de referência mencionadas;

    b) concentração de x mg por litro da substância em estudo (x tem normalmente o valor 2);

    c) concentração de 2 mg por litro de uma substância facilmente degradável e de x mg por litro da substância em estudo.

Ensaio de controlo físico-químico (facultativo)

28. Caso se opte por realizar análises específicas, pode realizar-se uma experiência físico-química para verificar se a substância em estudo é removida por mecanismos abióticos, por exemplo hidrólise ou adsorção. Pode realizar-se um ensaio de controlo físico-químico adicionando cloreto de mercúrio (II) ($HgCl_2$) [1] (50-100 mg/l), a fim de suspender a atividade microbiana, a frascos em duplicado que contenham a substância em estudo. Uma diminuição significativa, neste ensaio de controlo físico-químico, da concentração da substância específica indicia mecanismos de remoção abióticos.

Número de frascos para determinação da carência bioquímica de oxigénio normalmente utilizados num ensaio

29. Utilizam-se normalmente num ensaio os seguintes frascos:

    — pelo menos 8 com a substância em estudo;

    — pelo menos 8 apenas com água do mar enriquecida com nutrientes;

    — pelo menos 8 com a substância de referência; e, se necessário,

    — 6 frascos de verificação da toxicidade, com a substância em estudo e a substância de referência.

PROCEDIMENTO DE ENSAIO

30. Após a preparação, sifona-se de imediato o volume necessário de cada solução, a partir do quarto de volume inferior (mas não do fundo) do frasco grande adequado, para o grupo correspondente de frascos para determinação da carência bioquímica de oxigénio. Analisa-se de imediato o oxigénio dissolvido nos frascos de controlo do instante zero (ponto 33) ou conservam-se estes frascos efetuando uma precipitação com $MnCl_2$ (cloreto de manganês (II)) e NaOH (hidróxido de sódio), para análise química ulterior.

[1] O cloreto de mercúrio (II) ($HgCl_2$) é uma substância muito tóxica, que deve ser manuseada com as precauções adequadas. Os resíduos aquosos que a contenham devem ser eliminados de modo adequado; não devem ser encaminhados diretamente para a rede de esgotos.

▼M6

31. Incubam-se na obscuridade, à temperatura de ensaio (15-20 °C), os restantes frascos para determinação da carência bioquímica de oxigénio ensaiados em paralelo, retirando-os da zona de incubação a intervalos adequados (pelo menos após 5, 15 e 28 dias, por exemplo) e neles analisando em seguida o oxigénio dissolvido (ponto 33).

32. Filtram-se por membrana (0,2-0,45 μm) ou centrifugam-se durante 15 minutos as amostras destinadas a análises específicas (facultativo). Se não forem analisadas imediatamente, conservam-se estas amostras filtradas ou centrifugadas a 2-4 °C por períodos não superiores a 48 horas ou a -18 °C por períodos mais longos (caso se saiba que isso não afetará a substância em estudo, acidificam-se as amostras a pH 2 antes de serem armazenadas).

Determinação do oxigénio dissolvido

33. Determina-se a concentração de oxigénio dissolvido por meio de um método químico ou eletroquímico reconhecido a nível nacional ou internacional.

DADOS E RELATÓRIOS

Tratamento dos resultados

34. Registam-se os resultados analíticos na folha de dados apensa (apêndice 5).

35. Calcula-se a carência bioquímica de oxigénio como a diferença no consumo de oxigénio entre um branco e uma solução da substância em estudo nas condições de ensaio. Divide-se esse consumo líquido de oxigénio pela concentração (peso/volume) da substância, a fim de exprimir a carência bioquímica de oxigénio em mg de CBO/mg da substância em estudo. Define-se a degradação como a razão, expressa em percentagem, entre (de preferência) a carência bioquímica de oxigénio e a carência teórica de oxigénio ou então entre a carência bioquímica de oxigénio e a carência química de oxigénio (ver o ponto 36).

36. Calculam-se os valores de biodegradação correspondentes a cada momento de colheita de amostras e às substâncias em estudo e de referência por meio de uma das seguintes equações:

$$\%\ de\ biodegradação = \frac{mg\ \text{de}\ O_2 / mg\ de\ substância\ em\ estudo}{mg\ \text{de}\ CTO / mg\ de\ substância\ em\ estudo} \times 100$$

$$\%\ de\ biodegradação = \frac{mg\ \text{de}\ O_2 / mg\ de\ substância\ em\ estudo}{mg\ \text{de}\ CQO / mg\ de\ substância\ em\ estudo} \times 100$$

em que:

CTO = carência teórica de oxigénio (ver o cálculo no apêndice 3);

CQO = carência química de oxigénio, determinada experimentalmente.

Nota: Por vezes, as duas formas de cálculo (percentagem da CTO ou percentagem da CQO) não dão os mesmos resultados. É preferível utilizar a carência teórica de oxigénio, pois algumas substâncias não se oxidam completamente no ensaio de carência química de oxigénio.

37. Traça-se a curva da degradação em função do tempo como se ilustra na figura inserida no item «Validade e interpretação dos resultados». Caso se disponha de dados suficientes, calcula-se, a partir da curva de biodegradação, a fase de latência (t_L) e o tempo decorrido, após o termo dessa fase, até se atingir 50 % de remoção (t_{50}).

38. Caso se opte por realizar uma análise específica (facultativo), a percentagem de degradação primária corresponde à percentagem de remoção da substância específica no período de ensaio (após correção em função dos brancos analíticos).

▼M6

Relatório do ensaio

39. Elementos a constar do relatório do ensaio:

Substância em estudo

— estado físico e propriedades físico-químicas pertinentes;

— dados de identificação.

Condições de realização do ensaio

— localização e descrição do local de colheita das amostras; estado de poluição e nutrientes presentes (contagem de colónias, nitratos, amónio, fosfatos, se for caso disso);

— características da amostra — data e profundidade da colheita, aspeto, temperatura, salinidade, carbono orgânico dissolvido (facultativo), tempo decorrido entre a colheita e a utilização da amostra no ensaio;

— método eventualmente utilizado para envelhecer a água do mar;

— método utilizado no tratamento prévio da água do mar (filtração/sedimentação);

— método de determinação da carência química de oxigénio (se efetuada);

— método utilizado nas medições de oxigénio;

— processo de dispersão das substâncias fracamente solúveis nas condições do ensaio;

— método utilizado na determinação do número de microrganismos heterotróficos na água do mar (contagem em placas ou outro método);

— método utilizado na determinação do carbono orgânico dissolvido na água do mar (facultativo);

— método utilizado na análise específica (facultativo);

— outros métodos facultativos utilizados para caracterizar a água do mar (medições de ATP etc.).

Resultados

— registo dos resultados analíticos numa folha de dados (apêndice 5);

— traçado da curva de degradação em função do tempo num diagrama que mostre a fase de latência (t_L), o declive e o tempo decorrido, após o termo daquela fase, até se atingir 50 % do consumo final de oxigénio devido à oxidação da substância em estudo (t_{50}). Pode estimar-se graficamente a fase de latência como se ilustra na figura inserida adiante ou considerar-se corresponder essa fase ao período decorrido até se atingir 10 % de degradação;

— percentagem de degradação medida após 28 dias.

Discussão dos resultados.

Validade e interpretação dos resultados

40. A respiração no branco não deve exceder 30 % do oxigénio do frasco correspondente. Se não for possível satisfazer este critério utilizando amostras de água do mar colhidas recentemente, é necessário envelhecer (estabilizar) a água do mar antes de utilizar as amostras.

41. Há que ponderar a possibilidade de os resultados serem influenciados por substâncias azotadas.

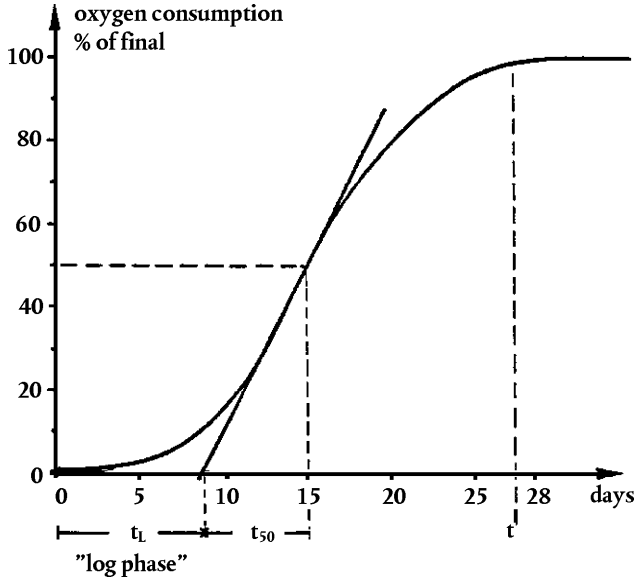
▼M6

42. Os resultados obtidos com as substâncias de referência benzoato de sódio e anilina devem ser comparáveis aos obtidos no estudo interlaboratorial comparativo (3) (ver o ponto 9). Se os resultados obtidos com as substâncias de referência forem atípicos, deve repetir-se o ensaio com outra amostra de água do mar.

43. Pode considerar-se que (à concentração utilizada) a substância em estudo inibe as bactérias se a carência bioquímica de oxigénio da mistura da substância de referência e da substância em estudo for inferior à soma das carências bioquímicas de oxigénio das soluções separadas das duas substâncias.

44. Dadas as concentrações relativamente elevadas utilizadas neste ensaio comparativamente à maior parte dos sistema naturais (e à consequente relação desfavorável entre as concentrações da substância em estudo e das outras fontes de carbono), deve encarar-se este método como um ensaio preliminar destinado a avaliar se uma substância é ou não facilmente biodegradável. Nessa perspetiva, um resultado baixo não significa necessariamente que a substância em estudo não é biodegradável em ambientes marinhos, mas antes que é necessário mais trabalho para tirar conclusões acerca disso.

Apresenta-se na figura seguinte um exemplo de uma experiência de degradação teórica que ilustra um modo de estimar os valores de t_L (duração da «fase de latência») e de t_{50} (tempo decorrido após t_L até se atingir 50 % do consumo final de oxigénio devido à oxidação da substância em estudo).



REFERÊNCIAS

1) de Kreuk J.F., Hanstveit, A.O. (1981). Determination of the biodegradability of the organic fraction of chemical wastes. *Chemosphere*, 10 (6); 561-573.

2) Capítulo C.4-B deste anexo: Determinação da biodegradabilidade «fácil» — Parte III, Teste de despiste da OCDE modificado.

3) Nyholm, N., Kristensen, P. (1987). Screening Test Methods for Assessment of Biodegradability of Chemical Substances in Seawater. Final Report of the ring test programme 1984-1985, março de 1987. Comissão das Comunidades Europeias.

4) Capítulo C.11 deste anexo: Biodegradação — Lamas activadas: ensaios de inibição da respiração.

5) Capítulo C.4-E deste anexo: Determinação da biodegradabilidade «fácil» — Parte VI, Ensaio em frasco fechado.

▼M6

Apêndice 1

Determinação do carbono orgânico na água do mar

MÉTODO DO BALÃO AGITADO

Para determinar o carbono orgânico de uma amostra de água, oxidam-se os compostos orgânicos da amostra a dióxido de carbono. Em geral, utiliza-se uma das seguintes técnicas:

— oxidação por via húmida com persulfatos/irradiação UV;

— oxidação por via húmida com persulfatos/temperatura elevada (116-130 °C);

— combustão.

Mede-se a quantidade libertada de CO_2 por espetrometria de infravermelhos ou titulação. Outra possibilidade consiste na redução do CO_2 a metano e na determinação quantitativa deste com um detetor de ionização de chama.

Recorre-se habitualmente ao método dos persulfatos/UV para analisar águas «limpas», com baixo teor de partículas. Os outros dois métodos são aplicáveis à maior parte das amostras de água: o método de oxidação pela via dos persulfatos/temperatura elevada é mais adequado para amostras com baixo teor de carbono orgânico; a técnica de combustão é aplicável a amostras com teor de carbono orgânico não-volátil bem acima de 1 mg de C/l.

Interferências

Em qualquer dos três métodos é necessário eliminar ou contrabalançar o carbono inorgânico presente da amostra. O método mais frequentemente utilizado para eliminar o carbono inorgânico consiste na purga do CO_2 da amostra acidificada, embora neste processo também se verifiquem perdas de compostos orgânicos voláteis (1). É necessário eliminar ou contrabalançar completamente o carbono inorgânico em todas as matrizes de amostras e, consoante o tipo de amostra, determinar o carbono orgânico volátil além do carbono orgânico não-volátil.

Concentrações elevadas de cloretos reduzem a eficiência oxidativa do método persulfatos/UV (2). Este interferência pode, no entanto, ser eliminada utilizando um reagente de oxidação modificado pela adição de nitrato de mercúrio (II). Quando se avaliem amostras que contenham cloretos, recomenda-se a utilização do máximo volume de amostra possível. No método de combustão, a presença de concentrações elevadas de sais nas amostras analisadas pode provocar a formação de depósitos salinos no catalisador e uma corrosão excessiva do tubo de combustão. É necessário tomar as precauções recomendadas no manual do fabricante.

No método dos persulfatos/UV, a oxidação de amostras muito turvas ou com partículas pode revelar-se incompleta.

Exemplo de um método adequado

Determina-se o carbono orgânico não-volátil por oxidação com persulfatos/irradiação UV e quantifica-se o CO_2 libertado por espetrometria de infravermelhos não-dispersiva.

Modifica-se o reagente de oxidação de acordo com as sugestões constantes da referência (2) e o referido no manual do fabricante:

a) Dissolvem-se 8,2 g de $HgCl_2$ e 9,6 g de $Hg(NO_3)_2.H_2O$ em algumas centenas de mililitros de água com baixo teor de carbono;

b) Dissolvem-se 20 g de $K_2S_2O_8$ na solução de sais de mercúrio;

▼**M6**

c) Adicionam-se à mistura 5 ml de HNO_3 (concentrado);

d) Completa-se o volume do reagente com água até 1 000 ml.

Elimina-se a interferência dos cloretos utilizando um volume de amostra de 40 µl para 10 % de cloretos e um volume de amostra de 200 µl para 1,9 % de cloretos. É possível analisar por este método amostras com concentrações elevadas de cloretos e/ou maiores volumes de amostra, desde que se impeça a acumulação de cloretos no recipiente de oxidação. Caso se justifique para o tipo de amostra em causa, pode, em seguida, determinar-se o carbono orgânico volátil.

REFERÊNCIAS

1) ISO, Water quality — determination of total organic carbon. Draft International Standard ISO/DIS 8245, 16 de janeiro de 1986.

2) American Public Health Association. Standard Methods for the Estimation of Water and Wastewater. American Water Works Association & Water Pollution Control Federation, 16.ª edição, 1985.

Também com interesse (descreve um sistema de autoanálise):

3) Schreurs, W. (1978). An automated colorimetric method for the determination of dissolved organic carbon in seawater by UV destruction. *Hydrobiological Bulletin*, 12, 137-142.

▼M6

Apêndice 2

Biodegradação na água do mar

MÉTODO DO BALÃO AGITADO

FOLHA DE DADOS

1. **LABORATÓRIO:**

2. **DATA DE INÍCIO DO ENSAIO:**

3. **SUBSTÂNCIA EM ESTUDO:**

Nome:

Concentração da solução de reserva:	mg da substância/l
Concentração inicial no meio (t_o):	mg da substância/l
	mg de carbono orgânico dissolvido/l

4. **ÁGUA DO MAR:**

Origem:

Data da colheita:

Profundidade da colheita:

Aspeto no momento da colheita (por exemplo turva etc.):

Salinidade no momento da colheita:	‰
Temperatura no momento da colheita:	°C
Carbono orgânico dissolvido «x» horas após a colheita:	mg/l

Tratamento prévio antes do ensaio (por exemplo filtração, sedimentação, envelhecimento etc.):

Contagem de colónias microbianas	— amostra original:	colónias/ml
	— no início do ensaio:	colónias/ml

Outras características:

5. **DETERMINAÇÕES DE CARBONO:**

Analisador de carbono:

	N.º do balão		Carbono orgânico dissolvido após n dias (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Ensaio de: água do mar com a substância em estudo, enriquecida com nutrientes	1	a_1					
		a_2					
		média, $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		média, $C_{b(t)}$					

▼**M6**

	N.º do balão		Carbono orgânico dissolvido após n dias (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Branco de: água do mar sem a substância em estudo, enriquecida com nutrientes	1	c_1					
		c_2					
		média, $C_{c(t)}$					
	2	d_1					
		d_2					
		média, $C_{d(t)}$					
	média, $C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **AVALIAÇÃO DOS DADOS BRUTOS:**

N.º do balão	Cálculo dos resultados	% de degradação após n dias				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
1	$D_1 = 1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \times 100$	0				
2	$D_2 = 1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \times 100$	0				
Média (*)	$D_t = \frac{D_1 + D_2}{2}$	0				

(*) Se D_1 e D_2 diferirem consideravelmente, não deve calcular-se a média correspondente.

Nota: Podem ser utilizados quadros semelhantes quando se realizar uma análise específica para acompanhar a degradação, bem como para a substância de referência e a experiência de verificação da toxicidade.

7. **DEGRADAÇÃO ABIÓTICA (facultativo)**

	Tempo (dias)	
	0	t
Concentração de carbono orgânico dissolvido (mg/l) no frasco de controlo estéril	$C_{ce(o)}$	$C_{ce(t)}$

$$\% \text{ de degradação abiótica} = \frac{C_{s(0)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

▼**M6**

Apêndice 3

Cálculo da carência bioquímica de oxigénio teórica

MÉTODO DO FRASCO FECHADO

Calcula-se do seguinte modo a carência teórica de oxigénio (CTO) da substância $C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$ de peso molecular PM:

$$CTO_{NH3} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl - 3n) + 3s + \frac{5}{2^p} + \frac{1}{2^{na}} - o\right]}{PM}$$

Este cálculo pressupõe a mineralização do C a CO_2, do H a H_2O, do P a P_2O_5 e do Na a Na_2O. Os halogéneos são eliminados sob a forma de halogenetos de hidrogénio e o azoto sob a forma de amoníaco.

Exemplo:

Glucose: $C_6H_{12}O_6$, PM = 180

$$CTO = \frac{16\left(2 \times 6 + \frac{1}{2} \times 12 - 6\right)}{180} = 1{,}07\ mg\ O_2/mg\ de\ glucose$$

Calculam-se os pesos moleculares dos sais que não sejam de metais alcalinos pressupondo a hidrólise dos mesmos.

Considera-se que o enxofre é oxidado ao estado de oxidação +6.

Exemplo:

n-Dodecilbenzenossulfonato de sódio: $C_{18}H_{29}SO_3Na$, PM = 348

$$CTO = \frac{16\left(36 + \frac{29}{2} + 3 + \frac{1}{2} - 3\right)}{348} = 2{,}34\ mg\ O_2/mg\ da\ substância$$

No caso das substâncias azotadas, o azoto pode ser eliminado sob a forma de amoníaco, nitritos ou nitratos, correspondentes a diferentes carências bioquímicas de oxigénio teóricas.

$$CTO_{NO2} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{3}{2^n} + \frac{5}{2_p} + \frac{1}{2^{na}} - o\right]}{PM}$$

$$CTO_{NO3} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{5}{2^n} + \frac{5}{2^p} + \frac{1}{2^{na}} - o\right]}{PM}$$

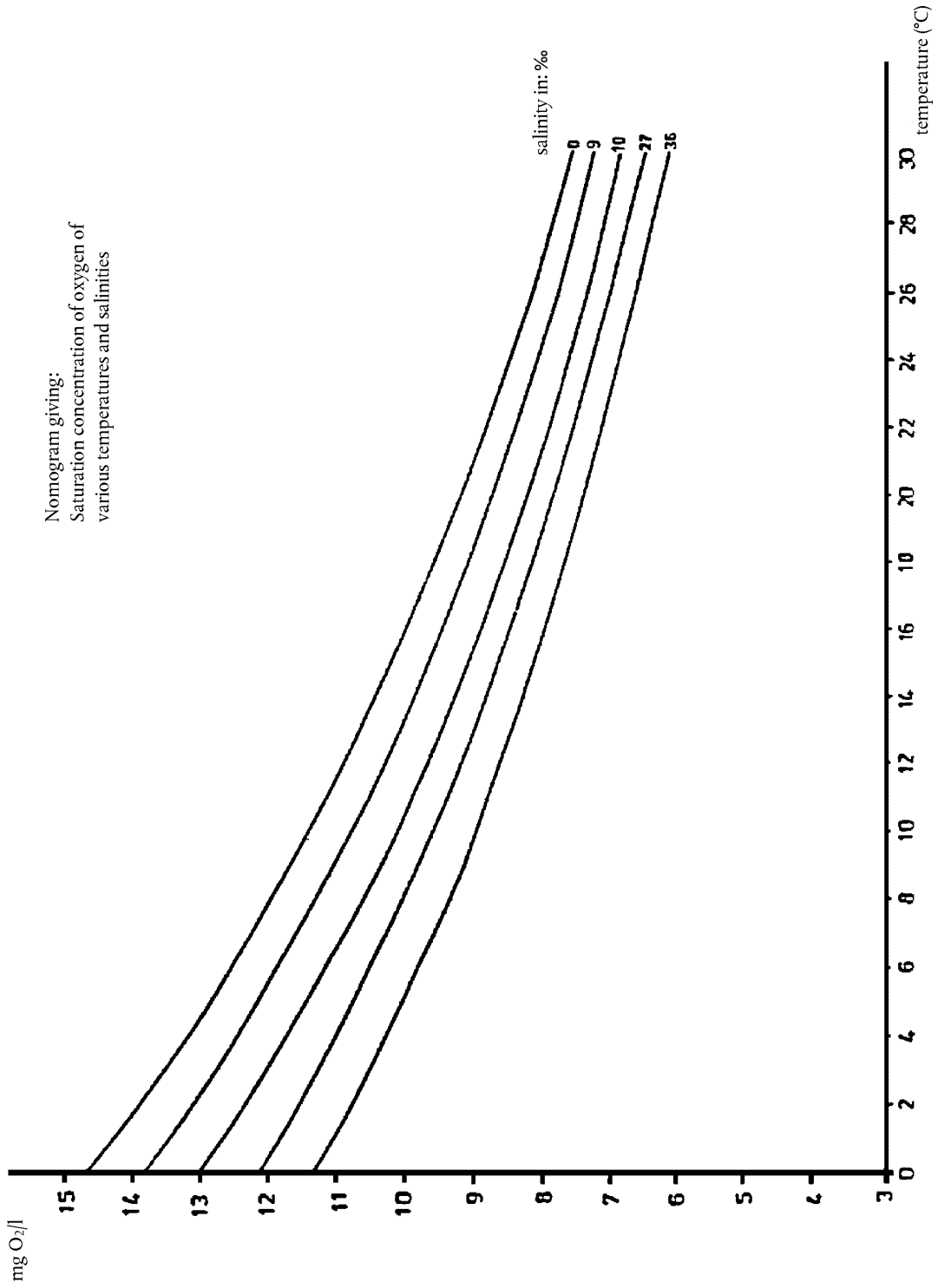
Admitindo que, no caso de uma amina secundária, a análise revelou a conversão total em nitratos:

$(C_{12}H_{25})_2NH$, PM = 353

$$CTO_{NO3} = \frac{16\left(48 + \frac{51}{2} + \frac{5}{2}\right)}{353} = 3{,}44\ mg\ O_2/mg\ da\ substância$$

▼**M6**

Apêndice 4



▼M6

Apêndice 5

Biodegradação na água do mar

MÉTODO DO FRASCO FECHADO

FOLHA DE DADOS

1. **LABORATÓRIO:**

2. **DATA DE INÍCIO DO ENSAIO:**

3. **SUBSTÂNCIA EM ESTUDO:**

Nome:

Concentração da solução de reserva:	mg/l
Concentração inicial do meio de água do mar:	mg/l
CTO ou CQO:	mg de 0_2/mg de substância em estudo

4. **ÁGUA DO MAR:**

Origem:

Data da colheita:

Profundidade da colheita:

Aspeto no momento da colheita (por exemplo turva etc.):

Salinidade no momento da colheita:	‰
Temperatura no momento da colheita:	°C
Carbono orgânico dissolvido «x» horas após a colheita:	mg/l

Tratamento prévio antes do ensaio (por exemplo filtração, sedimentação, envelhecimento etc.):

Contagem de colónias microbianas	— amostra original:	colónias/ml
	— no início do ensaio:	colónias/ml

Outras características:

5. **MEIO DE ENSAIO:**

Temperatura após arejamento:	°C
Concentração de O_2 após o arejamento e antes do início do ensaio:	mg O_2/l

6. **DETERMINAÇÃO DO OXIGÉNIO DISSOLVIDO:**

Método: Método de Winkler/elétrodo

	N.º do frasco		mg de O_2/l após n dias			
			0	5	15	28
Ensaio de: água do mar com a substância em estudo, enriquecida com nutrientes	1	a_1				
	2	a_2				
	Média dos ensaios	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$				

▼**M6**

	N.º do frasco		mg de O_2/l após n dias			
			0	5	15	28
Branco de: água do mar sem a substância em estudo, enriquecida com nutrientes	1	c_1				
	2	c_2				
	Média dos brancos	$m_b = \frac{c_1 + c_2}{2}$				

Nota: Podem ser utilizados quadros semelhantes para a substância de referência e a experiência de verificação da toxicidade.

7. **DIMINUIÇÃO DO OXIGÉNIO DISSOLVIDO: % DE DEGRADAÇÃO (% D):**

	Diminuição do oxigénio dissolvido após n dias		
	5	15	28
$(m_b - m_t)$ (1)			
$\% D = \frac{(m_b - m_t)(1)}{substância\ em\ estudo(mg/l) \times CTO} \times 100$			

(1) Presume-se neste caso que $m_{b(o)} = m_{s(o)}$, sendo:
$m_{b(o)}$ = valor do branco no dia 0,
$m_{s(o)}$ = valor da substância em estudo no dia 0.
Se $m_{b(o)}$ não for igual a $m_{s(o)}$, utiliza-se $(m_{s(o)} - m_{s(x)}) - (m_{b(o)} - m_{b(x)})$, sendo:
$m_{b(x)}$ = valor do branco no dia x,
$m_{s(x)}$ = valor da substância em estudo no dia x.

▼M6

C.43. ENSAIO DE BIODEGRADABILIDADE ANAERÓBIA DE SUBSTÂNCIAS ORGÂNICAS EM LAMAS DIGERIDAS: MÉTODO POR MEDIÇÃO DA PRODUÇÃO GASOSA

INTRODUÇÃO

1. Este método é equivalente ao *Test Guideline* TG 311 (2006) da OCDE. Existem vários ensaios de despistagem para avaliação da biodegradabilidade aeróbia de substâncias orgânicas (métodos de ensaio C.4, C.9, C.10 e C.11 (1) e *Test Guideline* TG 302C da OCDE (2)), cujos resultados têm sido utilizados com êxito para prever o devir de substâncias em meio aeróbio, em especial nos estádios aeróbios do tratamento de águas residuais. Proporções variáveis de substâncias insolúveis em água, bem como de substâncias adsorvidas aos sólidos das águas residuais, são igualmente sujeitas a tratamento aeróbio, pois estão presentes nas águas residuais decantadas. Porém, na sua maior parte, estas substâncias estão associadas às lamas de decantação primária, que são separadas das águas residuais não tratadas em tanques de decantação antes de o sobrenadante de águas residuais ser sujeito a tratamento aeróbio. Em seguida, as lamas, cujo líquido intersticial contém parte das substâncias solúveis, passam para digestores aquecidos, onde são sujeitas a tratamento anaeróbio. Até à data, não fazia parte desta série de métodos de ensaio nenhum método de avaliação da biodegradabilidade anaeróbia em digestores anaeróbios. O presente ensaio vem colmatar esta lacuna, mas não é necessariamente aplicável a outros compartimentos ambientais anóxicos.

2. Têm sido utilizadas com êxito na avaliação da biodegradabilidade anaeróbia técnicas respirométricas que medem a quantidade de gases produzida em condições anaeróbias, sobretudo metano (CH_4) e dióxido de carbono (CO_2). Birch *et al* (3) passaram em revista esses métodos e concluíram que os trabalhos mais completos eram os de Shelton e Tiedje (4), que se baseavam em estudos anteriores (5)(6)(7). O método (4), que foi aperfeiçoado por outros investigadores (8) e foi adotado nas normas dos E.U.A. (9)(10), não resolveu os problemas relacionados com a diferença de solubilidade do CO_2 e do CH_4 no meio de ensaio e com o cálculo da produção teórica de gases da substância em estudo. Ao recomendar a medição suplementar do teor de carbono inorgânico dissolvido (CID) do líquido sobrenadante, o relatório do ECETOC (3) veio alargar o campo de aplicação desta técnica. O método do ECETOC foi objeto de um exercício de calibração internacional (estudo interlaboratorial comparativo) e foi adotado como norma ISO 11734 (11).

3. O presente método de ensaio baseia-se na norma ISO 11734 (11) e descreve um método de despistagem para avaliação da biodegradabilidade anaeróbia potencial de substâncias orgânicas em condições específicas (num digestor anaeróbio, para um tempo definido e para uma gama determinada de concentrações de microrganismos). Dado que se utilizam lamas diluídas com uma concentração relativamente elevada da substância em estudo e que a duração do ensaio é normalmente maior do que o tempo de retenção nos digestores anaeróbios, as condições de ensaio não correspondem necessariamente às condições dos digestores anaeróbios nem o método é aplicável na avaliação da biodegradabilidade anaeróbia de substâncias orgânicas noutras condições ambientais. Expõem-se as lamas à substância em estudo durante um período que pode estender-se por 60 dias — mais longo, portanto, do que o tempo de retenção normal das lamas nos digestores anaeróbios (25 a 30 dias), embora os tempos de retenção possam ser muito mais longos em instalações industriais. Os resultados deste ensaio não permitem fazer previsões tão plausíveis como no caso da biodegradação aeróbia, pois os elementos recolhidos acerca do comportamento das substâncias estudadas em ensaios de biodegradabilidade aeróbia fácil e em ensaios de simulação e no ambiente aeróbio são suficientes para ter confiança na existência de uma conexão entre eles, ao passo que são escassos os elementos análogos relativamente ao ambiente anaeróbio. Pode considerar-se que a biodegradação anaeróbia é completa ao atingirem-se 75 % a 80 % da produção teórica de gases. As percentagens elevadas da substância em estudo relativamente à biomassa que são utilizadas neste ensaio implicam que, se uma substância se revelar biodegradável no ensaio, a probabilidade de se degradar num

▼M6

digestor anaeróbio será ainda maior. Por outro lado, as substâncias que não são convertidas em gases no ensaio podem não ser necessariamente persistentes em condições de percentagem da substância em relação à biomassa mais próximas da realidade ambiental. Além disso, ocorrem outras reações anaeróbias — por exemplo a descloração — que podem degradar as substâncias pelo menos parcialmente, mas este ensaio não as deteta. Porém, o recurso a determinados métodos analíticos de determinação da substância em estudo permite seguir o desaparecimento desta (ver os pontos 6, 30, 44 e 53).

PRINCÍPIO DO MÉTODO

4. Diluem-se cerca de dez vezes lamas digeridas e lavadas ([1]) com baixa concentração (<10 mg/l) de carbono inorgânico (CI), de modo a obter uma concentração total de sólidos de 1 g/l a 3 g/l. Em seguida, incubam-se com a substância em estudo (na concentração de 20-100 mg C/l), em recipientes hermeticamente fechados, a 35 °C ± 2 °C, durante um período que pode estender-se por 60 dias. Mede-se a atividade das lamas em brancos do inóculo de lamas ensaiados em paralelo no mesmo meio, mas sem a substância em estudo.

5. Mede-se o aumento de pressão no espaço livre acima da superfície do líquido nos recipientes, resultante da produção de dióxido de carbono e de metano. Nas condições do ensaio, muito do CO_2 produzido dissolve-se na fase líquida ou transforma-se em carbonatos ou hidrogenocarbonatos. Determina-se este carbono inorgânico no final do ensaio.

6. Calcula-se a quantidade de carbono (inorgânico e metano) resultante da biodegradação da substância em estudo a partir do excesso de produção de gases e do excesso de formação de carbono inorgânico na fase líquida, comparativamente aos valores apurados para os brancos. Calcula-se a biodegradação a partir do carbono metânico e do carbono inorgânico total produzidos, exprimindo-se o grau de biodegradação em percentagem da quantidade medida ou calculada de carbono incorporada pela substância em estudo. Pode acompanhar-se a evolução da biodegradação efetuando medições intermédias unicamente da produção de gases. Pode ainda determinar-se a biodegradação primária por meio de análises específicas efetuadas no início e no final do ensaio.

INFORMAÇÕES SOBRE A SUBSTÂNCIA EM ESTUDO

7. Para uma interpretação correta dos resultados, há que conhecer o grau de pureza, a hidrossolubilidade, a volatilidade e as características de adsorção da substância em estudo. É necessário conhecer o teor de carbono orgânico (percentagem ponderal) da substância, seja a partir da estrutura química desta seja por medição. No caso das substâncias voláteis, é útil dispor de uma constante de Henry medida ou calculada para decidir se o ensaio é aplicável ou não. Dispor de informações sobre a toxicidade da substância em estudo para bactérias anaeróbias facilita a escolha de uma concentração de ensaio adequada e a interpretação de resultados indicadores de baixa biodegradabilidade. A menos que se saiba que a substância em estudo não inibe a atividade de microrganismos anaeróbios, recomenda-se a inclusão no ensaio de uma experiência de verificação do poder inibidor da substância [ver o ponto 21 e a norma ISO 13641-1 (12)].

([1]) As lamas digeridas são constituídas por uma mistura das fases decantadas das águas residuais e das lamas ativadas, postas a incubar num digestor anaeróbio a cerca de 35 °C para reduzir a biomassa e os odores e melhorar a desidratabilidade das lamas. São constituídas por uma associação de bactérias metanogénicas e fermentativas anaeróbias que produzem dióxido de carbono e metano (11).

▼M6

APLICABILIDADE DO MÉTODO DE ENSAIO

8. Este método de ensaio é aplicável a substâncias hidrossolúveis, mas pode ser igualmente aplicado a substâncias pouco solúveis e a substâncias insolúveis, desde que se utilize um método de dosagem exato [ver, por exemplo, a norma ISO 10634 (13)]. No caso das substâncias voláteis, há, em geral, que decidir caso a caso. Pode ser necessário tomar medidas especiais, por exemplo evitar a libertação de gases durante o ensaio.

SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

9. Para verificar o funcionamento do protocolo, ensaia-se em paralelo uma substância de referência, incluindo recipientes adequados no ensaio normal. O fenol, o benzoato de sódio e o poli(etilenoglicol) 400 são exemplos de substâncias de referência: em 60 dias, a degradação destas substâncias deve exceder 60 % da produção teórica de gases (metano e carbono inorgânico) (3)(14).

REPRODUTIBILIDADE DOS RESULTADOS DO ENSAIO

10. Num estudo interlaboratorial comparativo internacional (14) houve boa reprodutibilidade das medições de pressão gasosa efetuadas em recipientes em triplicado. O desvio-padrão relativo (coeficiente de variação) foi quase sempre inferior a 20 %, embora tenha excedido com frequência 20 % na presença de substâncias tóxicas ou para o final do período de incubação de 60 dias. Os desvios também foram maiores nos recipientes de volume inferior a 150 ml. Os valores finais de pH do meio de ensaio situaram-se na gama 6,5--7,0.

11. Obtiveram-se os seguintes resultados no estudo interlaboratorial comparativo:

Substância em estudo	N.º total de resultados n_1	Degradação média (com base na totalidade dos resultados) (%)	Desvio-padrão relativo (com base na totalidade dos resultados) (%)	Resultados válidos n2	Degradação média (com base nos resultados válidos) (%)	Desvio-padrão relativo (com base nos resultados válidos) (%)	Degradação superior a 60 % nos ensaios válidos n_3
Ácido palmítico	36	68,7 ± 30,7	45	27	72,2 ± 18,8	26	19 = 70 % (*)
Poli(etilenoglicol) 400	38	79,8 ± 28,0	35	29	77,7 ± 17,8	23	24 = 83 % (*)

(*) Proporção de n_2.

12. Os coeficientes de variação da média de todos os valores obtidos com ácido palmítico e com poli(etilenoglicol) 400 atingiram, respetivamente, 45 % (n = 36) e 35 % (n = 38). Pondo de parte os valores de degradação inferiores a 40 % e superiores a 100 % (os primeiros atribuídos a condições sub-ótimas e os segundos a causas desconhecidas), os coeficientes de variação diminuem para 26 % e 23 %, respetivamente. A proporção de valores «válidos» que atingiram pelo menos 60 % de degradação foi de 70 % no caso do ácido palmítico e de 83 % no caso do poli(etilenoglicol) 400. A proporção das percentagens de biodegradação obtidas a partir de medições de carbono inorgânico dissolvido foi variável, mas relativamente baixa. No caso do ácido palmítico, variaram entre 0 e 35 %, com 12 % de média e 92 % de coeficiente de variação; no caso do poli(etilenoglicol) 400, variaram entre 0 e 40 %, com 24 % de média e 54 % de coeficiente de variação.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

Material e aparelhagem

13. Além do equipamento normal de laboratório, é necessário o seguinte:

a) Incubador à prova de faíscas e termostatizado a 35 °C ± 2 °C;

▼M6

b) Recipientes de ensaio de vidro resistentes à pressão, de capacidade nominal adequada ([1]), cada um dos quais dotado de um septo estanque a gases e capaz de suportar cerca de 2 bar. O volume acima da superfície do líquido deve representar 10 % a 30 % do volume total. Se a libertação de biogás for regular, é adequado um volume acima da superfície do líquido de aproximadamente 10 %; se a libertação de gases se verificar apenas no final do ensaio, é adequado um volume acima da superfície do líquido de 30 %. Se a pressão for libertada de cada vez que se colhem amostras, recomenda-se a utilização de garrafas de soro de vidro com 125 ml de volume nominal e volume total de aproximadamente 160 ml, seladas com septos próprios ([2]) fixados com sobrecápsulas de alumínio;

c) Dispositivo de medição da pressão ([3]) adaptado à medição e à evacuação dos gases produzidos, por exemplo um manómetro manual de precisão ligado a uma agulha de seringa adequada. Uma válvula de três vias estanque aos gases facilita a libertação do excesso de pressão (apêndice 1). É necessário que o volume interno das tubagens e da válvula do transdutor de pressão seja o menor possível, para que os erros resultantes de não se considerar o volume do equipamento sejam insignificantes;

Nota: Utilizam-se as leituras de pressão para calcular diretamente a quantidade de carbono produzido presente no espaço livre acima da superfície do líquido (pontos 42 a 44). Outra possibilidade é a conversão, por meio de um gráfico de conversão, das leituras de pressão em volumes (a 35 °C e à pressão atmosférica) de gases produzidos. Traça-se este gráfico a partir de dados obtidos por injeção de volumes conhecidos de azoto numa série de recipientes de ensaio (por exemplo garrafas de soro) a 35 °C +/- 2 °C e registo das leituras de pressão resultantes, uma vez estabilizadas (ver o apêndice 2). Explica-se o modo de cálculo na nota do ponto 44.

Precaução: Ao utilizar microsseringas, é necessário ter cuidado para evitar picadas das agulhas.

d) Analisador de carbono adequado para determinação direta de carbono inorgânico entre 1 mg/l e 200 mg/l;

e) Seringas de elevada precisão para amostras gasosas e líquidas;

f) Agitadores magnéticos com as respetivas barras de agitação (facultativo);

g) Câmara com luvas (recomendado).

Reagentes

14. Utilizam-se reagentes de qualidade analítica em todo o ensaio.

([1]) A capacidade recomendada é de 0,1 litro a 1 litro.

([2]) Recomenda-se a utilização de septos de silicone estanques aos gases, bem como a verificação da estanquidade das tampas das garrafas aos gases, sobretudo no caso dos septos de borracha butílica, pois, nas condições de realização do ensaio, vários septos comercializados não são suficientemente estanques ao metano e alguns septos perdem estanquidade depois de perfurados por uma agulha.

([3]) Este dispositivo deve ser utilizado e calibrado com regularidade, de acordo com as instruções do fabricante. Caso se utilize um manómetro com a qualidade prescrita, por exemplo encapsulado com uma membrana de aço, não é necessário calibrá-lo no laboratório. Pode verificar-se no laboratório a exatidão da calibração efetuando uma medição a 1×10^5 Pa e comparando-a com o resultado da mesma medição efetuada com um manómetro dotado de visor mecânico. Se este ponto for medido corretamente, a linearidade também se manterá inalterada. Caso se utilizem outros dispositivos de medição (sem calibração certificada pelo fabricante), recomenda-se que esses dispositivos sejam calibrados regularmente para toda a gama de valores de pressão.

▼M6

Água

15. Água destilada ou desionizada (desoxigenada por borbulhamento com azoto que contenha menos de 5 µl de oxigénio por litro), com menos de 2 mg de carbono orgânico dissolvido por litro.

Meio de ensaio

16. Prepara-se um meio de diluição com as seguintes quantidades dos componentes indicados:

Di-hidrogenofosfato de potássio anidro (KH_2PO_4)	0,27 g
Hidrogenofosfato de dissódio dodeca-hidratado ($Na_2HPO_4 \times 12H_2O$)	1,12 g
Cloreto de amónio (NH_4Cl)	0,53 g
Cloreto de cálcio di-hidratado ($CaC1_2 \times 2H_2O$)	0,075 g
Cloreto de magnésio hexa-hidratado ($MgCl_2 \times 6H_2O$)	0,10 g
Cloreto de ferro (II) tetra-hidratado ($FeCl_2 \times 4H_2O$)	0,02 g
Resazurina (indicador de oxigénio)	0,001 g
Sulfureto de sódio nona-hidratado ($Na_2S \times 9H_2O$)	0,10 g
Solução de reserva de elementos vestigiais (facultativo; ver o ponto 18)	10 ml
Água desoxigenada (ponto 15)	completar o volume até 1 litro

Nota: Para garantir suficiente capacidade redutora, é necessário utilizar sulfureto de sódio recente ou então é necessário lavá-lo e secá-lo antes de o utilizar. Este ensaio pode ser realizado sem recorrer a uma câmara com luvas (ver o ponto 26). Nesse caso, aumenta-se a concentração final de sulfureto de sódio do meio para 0,20 g de $Na_2S \times 9H_2O$ por litro. Pode igualmente adicionar-se o sulfureto de sódio utilizando uma solução de reserva anaeróbia adequada, injetando-o através do septo dos recipientes de ensaio fechados, processo que diminui o risco de oxidação. Pode substituir-se o sulfureto de sódio por citrato de titânio (III), a injetar através do septo dos recipientes de ensaio fechados de modo a obter uma concentração final de 0,8-1,0 mmol/l. O citrato de titânio (III) é um agente redutor muito eficaz e de baixa toxicidade. Prepara-se dissolvendo 2,94 g de citrato de trissódio di-hidratado em 50 ml de água desoxigenada (de modo a obter uma solução com a concentração de 200 mmol/l) e adicionando 5 ml de solução a 15 % (m/v) de cloreto de titânio (III); neutraliza-se a pH 7 ± 0,2 com uma base mineral e transfere-se para um recipiente adequado sob corrente de azoto. A concentração de citrato de titânio (III) nesta solução de reserva é de 164 mmol/l.

17. Misturam-se os componentes do meio de ensaio (exceto o agente redutor — sulfureto de sódio ou citrato de titânio) e, imediatamente antes da utilização, faz-se borbulhar azoto na solução durante 20 minutos, para remover o oxigénio. Em seguida, mesmo antes de utilizar o meio, adiciona-se o volume adequado de solução do agente redutor preparada de fresco (em água desoxigenada). Se necessário, ajusta-se o pH do meio a 7 ± 0,2 com uma base ou um ácido mineral diluído.

▼M6

Solução de reserva de elementos vestigiais (facultativo)

18. Para melhorar o processo de degradação anaeróbia, em especial se a concentração do inóculo for baixa (por exemplo 1 g/l), recomenda-se que o meio de ensaio contenha os seguintes elementos vestigiais (11):

Cloreto de manganês tetra-hidratado ($MnCl_2 \times 4H_2O$)	50 mg
Ácido bórico (H_3BO_3)	5 mg
Cloreto de zinco ($ZnCl_2$)	5 mg
Cloreto de cobre (II) ($CuCl_2$)	3 mg
Molibdato de dissódio di-hidratado ($Na_2MoO_4 \times 2H_2O$)	1 mg
Cloreto de cobalto hexa-hidratado ($CoCl_2 \times 6H_2O$)	100 mg
Cloreto de níquel hexa-hidratado ($NiCl_2 \times 6H_2O$)	10 mg
Selenito de dissódio (Na_2SeO_3)	5 mg
Água desoxigenada (ponto 15)	completar o volume até 1 litro

Substância em estudo

19. Adiciona-se a substância em estudo por meio de uma solução, suspensão ou emulsão de reserva ou diretamente no estado sólido ou líquido ou ainda adsorvida num filtro de fibras de vidro, de modo a obter uma concentração não superior a 100 mg de carbono orgânico por litro. Caso se recorra a soluções de reserva, prepara-se uma solução aquosa adequada (água previamente desoxigenada por borbulhamento com azoto, ponto 15) cuja concentração permita adicionar um volume inferior a 5 % do volume total da mistura reacional. Se necessário, ajusta-se o pH da solução de reserva a 7 ± 0,2. Caso o estudo incida em substâncias insuficientemente solúveis em água, deve consultar-se a norma ISO 10634 (13). Se for utilizado um solvente, realiza-se uma experiência de controlo adicional, adicionando ao meio inoculado apenas o solvente. Não podem ser utilizados solventes orgânicos que reconhecidamente inibam a produção de metano, como clorofórmio ou tetracloreto de carbono.

Precaução: As substâncias em estudo tóxicas e aquelas cujas propriedades sejam desconhecidas devem ser manuseadas com cuidado.

Substâncias de referência

20. Para verificar o funcionamento do protocolo, foram utilizadas com êxito substâncias de referência como o benzoato de sódio, o fenol e o poli(etileno glicol) 400, que se degradam mais de 60 % em 60 dias. Prepara-se uma solução de reserva (em água desoxigenada) da substância de referência escolhida do mesmo modo que para a substância em estudo e, se necessário, ajusta-se o pH a 7 ± 0,2.

Experiência de verificação do poder inibidor (facultativo)

21. A fim de obter informações sobre a toxicidade da substância em estudo para microrganismos anaeróbios e de determinar a concentração mais adequada a utilizar no ensaio, adiciona-se a substância em estudo e a substância de referência a um recipiente no qual se introduziu previamente o meio de ensaio (ver o ponto 16), de modo a obter concentrações daquelas idênticas às utilizadas no ensaio [ver os pontos 19 e 20 e a norma ISO 13641-1 (12)].

▼M6

Lamas digeridas

22. Colhem-se amostras de lamas digeridas no digestor de uma estação de tratamento de águas residuais que trate predominantemente efluentes domésticos. É necessário caracterizar completamente as lamas e inscrever no relatório as informações pertinentes relativas à origem das mesmas (ver o ponto 54). Caso se pretenda utilizar um inóculo adaptado, pode ponderar-se a colheita das lamas digeridas numa estação de tratamento de efluentes industriais. Para a colheita das lamas digeridas, utilizam-se garrafas expansíveis de gargalo largo, de polietileno de alta densidade ou de matéria similar. Enchem-se os recipientes de lamas até cerca de 1 cm da abertura dos mesmos e fecham-se hermeticamente, de preferência com uma válvula de segurança. Depois de transportadas para o laboratório, as lamas podem ser utilizadas diretamente ou ser colocadas num digestor laboratorial. Liberta-se o excesso de gases abrindo as garrafas de lamas cuidadosamente. Em alternativa, podem ser utilizadas como fonte inoculadora lamas anaeróbias produzidas no laboratório, mas o espetro de atividade destas pode estar alterado.

Precaução: As lamas digeridas comportam um risco de incêndio e de explosão, devido aos gases inflamáveis que produzem. Contêm ainda organismos potencialmente patogénicos. Por conseguinte, são necessárias precauções especiais ao manusear lamas. Por razões de segurança, não é conveniente utilizar recipientes de vidro para colher amostras de lamas.

23. A fim de reduzir a produção de fundo de gases e de diminuir a influência dos brancos, é de ponderar a digestão prévia das lamas. Caso se considere necessária uma digestão prévia, deixam-se as lamas em processo de digestão a 35 °C ± 2 °C, durante um período não superior a 7 dias, sem lhes adicionar nenhum nutriente ou substrato. No caso de um pequeno número de substâncias, verificou-se nos ensaios que uma digestão prévia de cerca de 5 dias normalmente otimiza a redução da produção gasosa do branco, sem dilatação inaceitável do período de latência ou do período de incubação durante o ensaio nem perdas de atividade.

24. No caso do estudo de substâncias que sejam ou se preveja que sejam pouco biodegradáveis, é de ponderar a exposição prévia das lamas à substância em estudo, a fim de obter um inóculo mais adaptado. Nessa eventualidade, adiciona-se a substância em estudo, à razão de 5-20 mg de carbono orgânico por litro, às lamas digeridas e incuba-se a mistura durante um período não superior a duas semanas. Antes de as utilizar, lavam-se cuidadosamente as lamas pré-expostas (ver o ponto 25). As condições desta exposição prévia devem constar do relatório do ensaio.

Inóculo

25. Para reduzir a menos de 10 mg/l a concentração de carbono inorgânico na suspensão final a ensaiar, lavam-se as lamas (ver os pontos 22 a 24) imediatamente antes da utilização. Centrifugam-se as lamas em tubos hermeticamente fechados (por exemplo 3 000 g durante 5 minutos) e descarta-se o sobrenadante. Prepara-se uma suspensão do depósito em meio desoxigenado (pontos 16 e 17), centrifuga-se esta nova suspensão e descarta-se o líquido sobrenadante. Se o teor de carbono inorgânico não for suficientemente diminuído, pode repetir-se esta lavagem das lamas ainda por duas vezes, no máximo. Esta operação parece não prejudicar os microrganismos. No final, prepara-se nova suspensão do depósito no volume requerido de meio de ensaio e determina-se a concentração total de sólidos (ver, por exemplo, a norma ISO 11923 (15)]. A concentração final de sólidos totais nos recipientes de ensaio deve situar-se entre 1 g/l e 3 g/l (ou cerca de 10 % da dita concentração nas lamas digeridas não-diluídas). Estas operações devem ser realizadas de modo a evitar ao máximo o contacto das lamas com oxigénio (por exemplo, pode utilizar-se uma atmosfera de azoto).

▼M6

PROTOCOLO DE ENSAIO

26. Nas etapas iniciais a seguir descritas, é importante utilizar técnicas que reduzam ao mínimo praticável o contacto entre as lamas digeridas e oxigénio; por exemplo, pode ser necessário trabalhar em atmosfera de azoto numa câmara com luvas e/ou purgar as garrafas com azoto (4).

Preparação dos recipientes de ensaio e dos recipientes de controlo

27. Preparam-se, pelo menos, recipientes em triplicado [ver o ponto 13, alínea b)] para a substância em estudo, o branco, a substância de referência e a experiência de verificação do poder inibidor (se for caso disso), assim como das câmaras de controlo da pressão (facultativo) (ver os pontos 7 e 19 a 21). Podem igualmente ser preparados recipientes adicionais para avaliação da biodegradação primária por meio de análises específicas da substância em estudo. Desde que os volumes livres acima da superfície do líquido sejam homogéneos, pode utilizar-se a mesma série de brancos para estudar várias substâncias no mesmo ensaio.

28. Prepara-se o inóculo diluído antes de o transferir para os recipientes (recorrendo, por exemplo, a uma pipeta de boca larga). Transferem-se alíquotas de inóculo bem misturado (ponto 25), para que a concentração total de sólidos seja a mesma em todos os recipientes (entre 1 g/l e 3 g/l). Ajusta-se, se necessário, o pH a 7 ± 0,2 e adicionam-se em seguida as soluções de reserva da substância em estudo e da substância de referência, pela via mais adequada (ponto 19).

29. A concentração experimental de carbono orgânico situa-se normalmente entre 20 mg/l e 100 mg/l (ponto 4). Se a substância em estudo for tóxica, reduz-se a concentração experimental a 20 mg de C/l — ou mesmo mais, caso se pretenda medir apenas a biodegradação primária, por meio de análises específicas. Importa ter presente que a variabilidade dos resultados do ensaio aumenta a baixas concentrações experimentais.

30. Nos recipientes do branco, em vez de solução, suspensão ou emulsão de reserva, adiciona-se uma quantidade equivalente do veículo utilizado para a substância em estudo. Se a substância em estudo tiver sido adicionada por meio de filtros de fibra de vidro ou de solventes orgânicos, adiciona-se aos brancos um filtro ou um volume de solvente equivalente ao evaporado. Prepara-se um replicado adicional com a substância em estudo para determinação do valor do pH. Se necessário, ajusta-se o pH a 7 ± 0,2 com pequenas quantidades de um ácido ou de uma base minerais diluídos. Adicionam-se as mesmas quantidades de agentes neutralizantes a todos os recipientes de ensaio. Estas adições não devem ser necessárias porque o pH das soluções de reserva da substância em estudo e da substância de referência foi previamente ajustado (ver os pontos 19 e 20). Caso se pretenda medir a biodegradação primária, colhe-se uma amostra adequada no recipiente destinado à verificação do pH, ou num recipiente de ensaio adicional, e determina-se a concentração da substância em estudo por meio de análises específicas. Se as misturas reacionais forem agitadas (facultativo), colocam-se barras magnéticas revestidas em todos os recipientes.

31. É necessário que o volume total de líquido, V_1, e o volume do espaço livre acima da superfície do líquido, V_h, sejam idênticos em todos os recipientes (anotar e registar os valores de V_1 e V_h). Fecha-se hermeticamente cada recipiente com um septo estanque a gases e transferem-se os recipientes da câmara de luvas (ver o ponto 26) para o incubador [ver o ponto 13, alínea a)].

▼M6

Estudo de substâncias insolúveis

32. No caso das substâncias pouco hidrossolúveis, pesam-se quantidades adequadas das substâncias em causa e adicionam-se diretamente aos recipientes já preparados. Se for necessário utilizar um solvente (ver o ponto 19), transfere-se a solução ou suspensão da substância em estudo para recipientes vazios. Se possível, evapora-se o solvente passando uma corrente de azoto através dos recipientes e adicionam-se em seguida os outros ingredientes, nomeadamente as lamas diluídas (ponto 25) e a água desoxigenada necessárias. Prepara-se igualmente uma experiência adicional de controlo do solvente (ver o ponto 19). A norma ISO 10634 (13) apresenta outros métodos de adição de substâncias insolúveis. Se for de prever que o pH inicial não exceda 7 ± 1, as quantidades necessárias de substâncias em estudo líquidas podem ser introduzidas com uma seringa em recipientes já completamente preparados e hermeticamente fechados; caso contrário, procede-se como foi descrito (ponto 19).

Incubação e medições da pressão gasosa

33. Incubam-se os recipientes preparados, a 35 °C ± 2 °C, durante cerca de uma hora, para que atinjam o equilíbrio, e liberta-se o excesso de gases para a atmosfera, por exemplo agitando os recipientes um a um, introduzindo a seringa do manómetro [ponto 13, alínea c)] através do septo e abrindo a válvula, até o manómetro indicar o valor zero. Se, nesta fase, ou quando das medições intermédias, a pressão no espaço livre acima da superfície do líquido for inferior à pressão atmosférica, é necessário injetar azoto para restabelecer a pressão atmosférica. Em seguida, fecha-se a válvula [ponto 13, alínea c)] e continua a incubar-se na obscuridade, procedendo de modo que todas as partes dos recipientes sejam mantidas à temperatura de digestão. Após 24-48 horas de incubação, examinam-se os recipientes. Rejeitam-se os que apresentem uma coloração rosa distinta no líquido sobrenadante, reveladora da mudança de cor da resazurina (ponto 16), indicativa da presença de oxigénio (ver o ponto 50). Embora o sistema possa tolerar pequenas quantidades de oxigénio, concentrações mais elevadas podem inibir fortemente a biodegradação anaeróbia. É aceitável a rejeição esporádica de um dos recipientes de um triplicado, mas a necessidade de rejeições mais frequentes exige uma verificação dos protocolos experimentais e a repetição do ensaio.

34. Mistura-se cuidadosamente o conteúdo de cada recipiente por meio do agitador magnético ou agitando o próprio recipiente, durante alguns minutos, pelo menos duas ou três vezes por semana e pouco antes de cada medição de pressão. A agitação volta a dispersar o inóculo na suspensão e promove o equilíbrio gasoso. É necessário que as medições de pressão sejam efetuadas com rapidez, para evitar que a temperatura dos recipientes de ensaio baixe e origine leituras erradas. Ao medir a pressão, há que manter a totalidade do recipiente de ensaio, incluindo o espaço livre acima da superfície do líquido, à temperatura de digestão. Para medir a pressão gasosa, pode, por exemplo, introduzir-se através do septo a agulha de uma seringa [ponto 13, alínea c] ligada ao manómetro. Há que tomar as precauções necessárias para evitar a entrada de água na agulha. Se isso acontecer, secam-se as partes húmidas e utiliza-se outra agulha. Mede-se a pressão em milibares (ponto 42). Pode medir-se periodicamente a pressão gasosa nos recipientes (por exemplo semanalmente) e, facultativamente, libertar-se o excesso de gases para a atmosfera. Em alternativa, mede-se a pressão apenas no final do ensaio, para determinar a quantidade de biogás produzida.

35. Recomenda-se a realização de leituras intermédias da pressão gasosa, pois o aumento da pressão dá indicações quanto ao momento de pôr termo ao ensaio e permite seguir a cinética do processo (ver o ponto 6).

▼M6

36. Normalmente, põe-se termo ao ensaio após 60 dias de incubação, a menos que a curva de biodegradação obtida a partir das medições de pressão atinja antes um patamar (fase na qual a degradação máxima já foi atingida e a curva de biodegradação estabilizou). Se o valor correspondente ao patamar for inferior a 60 %, a interpretação é problemática, pois um resultado deste tipo é indicativo de mineralização parcial da molécula ou da ocorrência de um erro. Se, no final do período normal de incubação, persistir a produção de gases mas não se tiver manifestamente atingido um patamar, é de ponderar a continuação do ensaio, para verificar se a curva de biodegradação atinge um patamar (>60 %).

Medição do carbono inorgânico

37. No final do ensaio, após a última medição de pressão gasosa, deixam-se as lamas decantar. Abrem-se os recipientes um a um e colhe-se de imediato em cada um deles uma amostra para determinação da concentração (mg/l) de carbono inorgânico no líquido sobrenadante. Não se centrifuga nem filtra o líquido sobrenadante, pois haveria uma perda inaceitável de dióxido de carbono dissolvido. Caso não seja possível analisar o líquido sobrenadante logo após a colheita das amostras, guarda-se o mesmo durante um máximo de dois dias em frascos hermeticamente fechados totalmente cheios, refrigerados a cerca de 4 °C. Depois de medido o carbono inorgânico, mede-se e regista-se o valor do pH.

38. Em alternativa, pode determinar-se indiretamente o carbono inorgânico no líquido sobrenadante através da medição, no espaço livre acima da superfície do líquido, do dióxido de carbono libertado pelo carbono inorgânico dissolvido. Para isso, após a última medição de pressão gasosa, ajusta-se a pressão em cada recipiente de ensaio à pressão atmosférica. Em seguida, adicionando através do septo dos recipientes hermeticamente fechados um ácido mineral concentrado (por exemplo H_2SO_4), acidifica-se o conteúdo de cada recipiente a pH aproximadamente 1. Agitam-se os recipientes e incubam-se a 35 °C ± 2 °C durante aproximadamente 24 horas, medindo-se em seguida com o manómetro a pressão gasosa resultante do dióxido de carbono libertado.

39. Efetuam-se leituras análogas nos recipientes dos brancos e da substância de referência e, se for o caso, nos recipientes de verificação do poder inibidor (ver o ponto 21).

40. Em alguns casos, em especial se forem utilizados os mesmos recipientes de controlo para várias substâncias em estudo, é de ponderar a realização de medições intermédias das concentrações de carbono inorgânico nos recipientes de ensaio e de controlo. Nessa eventualidade, é necessário preparar um número de recipientes suficiente para as medições intermédias. É preferível proceder assim, em vez de colher todas as amostras no mesmo recipiente. Esta última possibilidade só é admissível se o volume necessário para a análise do carbono inorgânico dissolvido não for demasiado elevado. Para medir o carbono inorgânico dissolvido, não se liberta o excesso de gases após medição da pressão gasosa e procede-se do seguinte modo:

— sem abrir os recipientes e introduzindo uma seringa através do septo, colhe-se o menor volume possível de amostra do líquido sobrenadante e determina-se o carbono inorgânico de cada amostra;

— depois de colhida a amostra, pode ou não evacuar-se o excesso de gases;

— há que ter em conta que mesmo um pequeno decréscimo do volume do líquido sobrenadante (por exemplo 1 %) pode aumentar significativamente o volume (V_h) dos gases existentes no espaço livre acima da superfície desse líquido;

— se necessário, corrigem-se as equações (ver o ponto 44) aumentando V_h na equação 3.

▼M6

Análises específicas

41. Caso se pretenda determinar a degradação anaeróbia primária (ver o ponto 30), colhe-se no início e no final do ensaio, para a realização de análises específicas, um volume adequado de amostra nos recipientes que contêm a substância em estudo. Ao proceder-se deste modo, os volumes do espaço livre acima da superfície do líquido (V_h) e o volume de líquido (V_l) modificar-se-ão e é necessário tê-lo em conta no cálculo dos resultados da produção de gases. Em alternativa, as amostras para realização de análises específicas podem ser colhidas em misturas adicionais previamente preparadas para este efeito (ponto 30).

DADOS E RELATÓRIOS

Tratamento dos resultados

42. Por razões práticas, mede-se a pressão gasosa em milibares (1 mbar = 1 hPa = 10^2 Pa; 1 Pa = 1 N/m^2), o volume em litros e a temperatura em graus Celsius.

Carbono presente no espaço livre acima da superfície do líquido

43. Dado que uma mole de metano e uma mole de dióxido de carbono contêm, cada uma, 12 g de carbono, pode exprimir-se do seguinte modo a massa de carbono num determinado volume de gases libertado:

$$m = 12 \times 10^3 \times n \quad \text{Equação [1]}$$

em que:

m = massa de carbono (mg) num dado volume de gases libertado;

12 = massa atómica relativa do carbono;

n = número de moles de gases no volume em causa.

Caso seja gerado em quantidades consideráveis outro gás além do metano e do dióxido de carbono (por exemplo N_2O), é necessário alterar a equação [1] de modo a descrever os efeitos potenciais dos gases gerados.

44. De acordo com a lei dos gases perfeitos, pode exprimir-se *n* do seguinte modo:

$$n = \frac{pV}{RT} \quad \text{Equação [2]}$$

em que:

p = pressão gasosa (em pascal);

V = volume dos gases (m^3);

R = constante universal dos gases perfeitos [8,314 J/(molK)];

T = temperatura de incubação (kelvin).

Combinando as equações [1] e [2] e introduzindo as adaptações necessárias para ter em conta a produção gasosa do branco, obtém-se:

$$m_h = \frac{12\,000 \times 0{,}1(\Delta p \cdot V_h)}{RT} \quad \text{Equação [3]}$$

em que:

m_h = massa líquida de carbono gasoso no espaço livre acima da superfície do líquido (mg);

D*p* = resultado da subtração, à média da diferença entre as pressões inicial e final nos recipientes de ensaio, da média correspondente nos recipientes do branco (milibar);

▼M6

V_h = volume do espaço livre acima da superfície do líquido (l);

0,1 = fator de conversão de newton/m^2 em milibar e de m^3 em litro.

Para a temperatura de incubação normal (35 °C = 308 K), utiliza-se a equação [4]:

$$m_h = 0{,}468(\Delta p \cdot V_h) \quad \text{Equação [4]}$$

Nota: Cálculo alternativo do volume — Conversão das leituras manométricas em mililitros de gases produzidos utilizando a curva de referência obtida por representação das leituras manométricas em função do volume injetado (ml) (apêndice 2). Calcula-se o número de moles (n) de gases presentes no espaço livre acima da superfície do líquido de cada recipiente dividindo a produção gasosa acumulada (ml) por 25 286 ml/mole, que representa o volume ocupado por uma mole de gases à pressão atmosférica normal e 35 °C. Dado que uma mole de CH_4 e uma mole de CO_2 contêm, cada uma, 12 g de carbono, pode exprimir-se pela equação [5] a quantidade de carbono (m_h, em miligrama) presente no espaço livre acima da superfície do líquido:

$$m_h = 12 \times 10^3 \times n \quad \text{Equação [5]}$$

Adaptando esta equação de modo a ter em conta a produção gasosa do branco, obtém-se a seguinte equação:

$$m_h = \frac{12\ 000 \times \Delta V}{25\ 286} = 0{,}475\Delta V \qquad \text{Equação [6]}$$

em que:

m_h = massa líquida de carbono gasoso no espaço livre acima da superfície do líquido (mg);

DV = média da diferença entre o volume de gases no espaço livre acima da superfície do líquido nos recipientes de ensaio e nos recipientes do branco;

25286 = volume ocupado por uma mole de gases a 35 °C e a uma atmosfera.

45. Pode acompanhar-se a biodegradação representando o aumento de pressão acumulado, Dp (milibar), em função do tempo. A partir desta curva, identifica-se e regista-se a fase de latência (dias). A fase de latência é a que decorre desde o início do ensaio até começar uma degradação significativa (ver exemplo no apêndice 3). Caso tenham sido colhidas e analisadas amostras intermédias do líquido sobrenadante (ver os pontos 40, 46 e 47), pode representar-se graficamente a função do carbono total produzido (acumulado na fase gasosa e na fase líquida), em vez da pressão acumulada unicamente.

Carbono presente no líquido

46. Despreza-se a quantidade de metano no líquido, pois sabe-se que a hidrossolubilidade deste gás é muito baixa. Calcula-se a massa de carbono inorgânico no líquido dos recipientes de ensaio por meio da seguinte equação:

$$m_l = C_{net} \times V_l \quad \text{Equação [7]}$$

em que:

m_l = massa de carbono inorgânico no líquido (mg);

C_{net} = diferença entre a concentração de carbono inorgânico nos recipientes de ensaio e a concentração de carbono inorgânico nos recipientes de controlo, no final do ensaio (mg/l);

V_l = volume de líquido no recipiente (l).

▼M6

Carbono gaseificado total

47. Calcula-se a massa total de carbono gaseificado em cada recipiente por meio da seguinte equação:

$$m_t = m_h + m_l \qquad \text{Equação [8]}$$

em que:

m_t = massa total de carbono gaseificado (mg);

m_h e m_l são definidos acima.

Carbono da substância em estudo

48. Calcula-se a massa de carbono em cada recipiente de ensaio, proveniente da substância em estudo adicionada, por meio da seguinte equação:

$$m_v = C_c \times V_l \qquad \text{Equação [9]}$$

em que:

m_v = massa de carbono proveniente da substância em estudo (mg);

C_c = concentração de carbono proveniente da substância em estudo no recipiente de ensaio (mg/l);

V_l = volume de líquido no recipiente de ensaio (l).

Grau de biodegradação

49. Por meio da equação [10], calcula-se a percentagem de biodegradação a partir dos gases presentes no espaço livre acima da superfície do líquido; por meio da equação [11], calcula-se a percentagem total de biodegradação:

$$D_h = (m_h/m_v) \times 100 \qquad \text{Equação [10]}$$

$$D_t = (m_t/m_v) \times 100 \qquad \text{Equação [11]}$$

em que:

D_h = biodegradação com base nos gases presentes no espaço livre acima da superfície do líquido (%);

D_t = biodegradação total (%);

m_h, m_v e m_t são definidas acima.

Calcula-se o grau de biodegradação primária por meio da equação [12], a partir de medições (facultativas) da concentração da substância em estudo no início e no final da incubação:

$$D_p = (1 - S_e/S_i) \times 100 \qquad \text{Equação [12]}$$

em que:

D_p = degradação primária da substância em estudo (%);

S_i = concentração inicial da substância em estudo (mg/l);

S_f = concentração final da substância em estudo (mg/l).

Se o método de análise indicar concentrações significativas da substância em estudo no inóculo inalterado de lamas anaeróbias, utiliza-se a equação [13]:

▼M6

$$D_p^{\ 1} = [1 - (S_e - S_{eb})/(S_i - S_{ib})] \times 100 \qquad \text{Equação [13]}$$

em que:

$D_p^{\ 1}$ = degradação primária corrigida da substância em estudo (%);

S_{ib} = concentração inicial «aparente» da substância em estudo nos brancos (mg/l);

S_{fb} = concentração final «aparente» da substância em estudo nos brancos (mg/l).

Validade dos resultados

50. Apenas se podem utilizar leituras de pressão relativas a recipientes que não evidenciem coloração rosa (ver o ponto 33). Minimiza-se a contaminação por oxigénio recorrendo a técnicas adequadas de manipulação anaeróbia.

51. Pode considerar-se o ensaio válido se a substância de referência atingir um patamar que represente mais de 60 % de biodegradação ([1]).

52. Se, no final do ensaio, o pH não estiver compreendido no intervalo 7 ± 1 e a percentagem de biodegradação verificada for insuficiente, repete-se o ensaio aumentando o poder de tamponamento do meio.

Inibição da degradação

53. A produção de gases nos recipientes que contêm a substância em estudo e a substância de referência tem de ser, pelo menos, igual à produção de gases nos recipientes que contêm apenas a substância de referência. A situação contrária indicia inibição da produção gasosa. Em alguns casos, a produção de gases nos recipientes que contêm a substância em estudo, mas não a substância de referência, pode ser inferior à produção de gases dos brancos, constituindo isso indício de poder inibidor da substância em estudo.

Relatório do ensaio

54. Elementos a constar do relatório do ensaio:

Substância em estudo

— denominação comum, denominação química, número CAS, fórmula estrutural e propriedades físico-químicas pertinentes;

— grau de pureza da substância (presença de impurezas);

Condições de realização do ensaio

— volume do líquido diluído do digestor (V_l) e volume do espaço livre acima da superfície do líquido (V_h) em cada recipiente;

— descrição dos recipientes de ensaio, das principais características da medição do biogás (por exemplo o tipo de manómetro) e do analisador de carbono inorgânico;

— aplicação da substância em estudo e da substância de referência ao sistema de ensaio: concentrações utilizadas no ensaio e eventual utilização de solventes;

— caracterização do inóculo utilizado: nome da estação de tratamento de águas residuais, descrição da fonte de águas residuais tratada (por exemplo temperatura de funcionamento, tempo de retenção das lamas, origem predominantemente doméstica ou não etc.), concentração, informações necessárias para fundamentar o que precede e informações sobre eventuais tratamentos prévios do inóculo (por exemplo digestão ou exposição prévias);

— temperatura de incubação;

— número de replicados.

([1]) A reavaliar se forem incluídas substâncias de referência adsorventes ou insolúveis.

▼M6

Resultados

— valores de pH e do carbono inorgânico no final do ensaio;

— caso tenham sido efetuadas medições específicas, concentração da substância em estudo no início e no final do ensaio;

— quadros com todos os dados medidos nos recipientes de ensaio, dos brancos e da substância de referência e, se for caso disso, nos recipientes de verificação do poder inibidor (por exemplo pressão em milibar e concentração de carbono inorgânico em mg/l); os dados relativos ao espaço livre acima da superfície do líquido indicam-se separadamente dos dados relativos ao líquido;

— tratamento estatístico dos dados, duração do ensaio e diagrama da biodegradação da substância em estudo, da substância de referência e na experiência de verificação do poder inibidor;

— percentagem de biodegradação da substância em estudo e da substância de referência;

— motivos das eventuais rejeições de resultados do ensaio;

— discussão dos resultados.

REFERÊNCIAS

1) Os seguintes capítulos deste anexo:

C.4: Determinação da biodegradabilidade «fácil»;

C.9: Biodegradação — Ensaio de Zahn e Wellens;

C.10: Ensaio de simulação do tratamento aeróbio de efluentes:

A: Unidades de lamas ativadas, B: Biofilmes;

C.11: Biodegradação — Lamas ativadas: ensaios de inibição da respiração.

2) OCDE (2009). Inherent Biodegradability: Modified MITI Test (II). OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 302C. OCDE, Paris.

3) Birch, R.R., Biver, C., Campagna, R., Gledhill, W.E., Pagga, U., Steber, J., Reust, H., Bontinck, W.J. (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. *Chemosphere*, 19, 1527-1550. (Igualmente publicado como Relatório Técnico do ECETOC n.º 28, junho de 1988).

4) Shelton, D.R., Tiedje, J.M. (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential. *Appl. Environ. Microbiology*, 47, 850-857.

5) Owen, W.F., Stuckey, D.C., Healy J.B., Jr., Young, L.Y., McCarty, P.L. (1979). Bioassay for monitoring biochemical methane potential and anaerobic toxicity. *Water Res.*, 13, 485-492.

6) Healy, J.B., Jr., Young, L.Y. (1979). Anaerobic biodegradation of eleven aromatic compounds to methane. *Appl. Environ. Microbiol.*, 38, 84-89.

7) Gledhill, W.E. (1979). Proposed standard practice for the determination of the anaerobic biodegradation of organic chemicals. Working document. *Draft* 2 No. 35.24. American Society for Testing Materials, Filadélfia.

8) Battersby, N.S., Wilson, V. (1988). Evaluation of a serum bottle technique for assessing the anaerobic biodegradability of organic chemicals under methanogenic conditions. *Chemosphere*, 17, 2441-2460.

9) E1192-92. Standard Test Method for Determining the Anaerobic Biodegradation Potential of Organic Chemicals. ASTM, Filadélfia.

▼**M6**

10) US EPA (1998). Fate, Transport and Transformation Test Guidelines: OPPTS 835.3400, Anaerobic Biodegradability of Organic Chemicals.

11) International Organization for Standardization (1995). ISO 11 734: Water Quality — Evaluation of the ultimate anaerobic biodegradation of organic compounds in digested sludge — Method by measurement of the biogas production.

12) International Organization for Standardization (2003). ISO 13 641-1: Water Quality — Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria — Part 1, General Test.

13) International Organization for Standardization (1995). ISO 10 634: Water Quality — Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

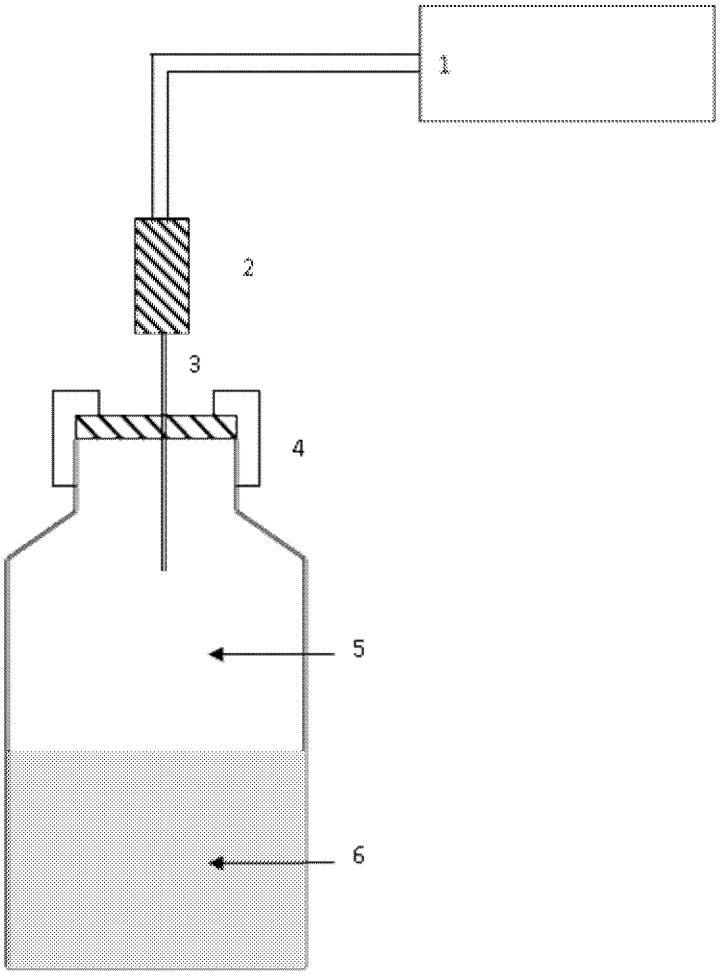
14) Pagga, U., Beimborn, D.B. (1993). Anaerobic biodegradation test for organic compounds. *Chemosphere*, 27, 1499-1509.

15) International Organization for Standardization (1997). ISO 11 923: Water Quality — Determination of suspended solids by filtration through glass-fibre filters.

▼**M6**

Apêndice 1

Exemplo de montagem para medição da produção de biogás a partir da pressão gasosa



Legenda:

1 — Manómetro;

2 — Válvula de três vias estanque a gases;

3 — Agulha de seringa;

4 — Tampa estanque a gases (septo e sobrecápsula de aperto);

5 — Espaço livre acima da superfície do líquido (V_h);

6 — Inóculo de lamas digeridas (V_l).

Mantêm-se os recipientes de ensaio a 35 °C ± 2 °C.

▼M6

Apêndice 2

Conversão das medições manométricas

As leituras manométricas podem ser relacionadas com volumes de gases por meio de uma curva-padrão gerada com base na injeção de volumes conhecidos de ar a 35 °C ± 2 °C em frascos de soro com um volume de água igual ao da mistura reacional, V_R:

— Transferem-se alíquotas de V_R ml de água, mantidas a 35 °C ± 2 °C, para cinco frascos de soro. Fecham-se hermeticamente os frascos e colocam-se estes num banho de água a 35 °C durante uma hora, para que atinjam o equilíbrio;

— Liga-se o manómetro, deixa-se estabilizar e regula-se a zero;

— Insere-se uma agulha de seringa através do septo de um dos frascos, abre-se a válvula até a leitura do manómetro ser zero e fecha-se a válvula;

— Repete-se este procedimento com os outros frascos;

— Injeta-se 1 ml de ar a 35 °C ± 2 °C em cada frasco. Insere-se a agulha (montada no manómetro) através do septo de um dos frascos e deixa-se estabilizar a leitura de pressão. Regista-se a pressão, abre-se a válvula até a leitura de pressão ser zero e volta a fechar-se a válvula;

— Repete-se este procedimento com os outros frascos;

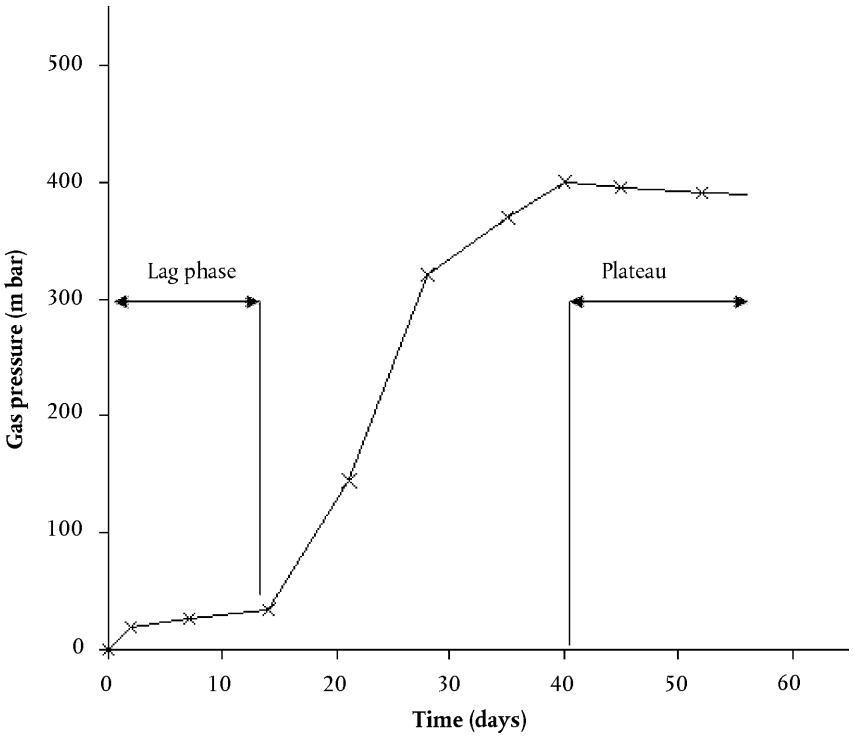
— Repete-se o procedimento descrito utilizando 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml, 12 ml, 16 ml, 20 ml e 50 ml de ar;

— Traça-se uma curva de pressão (Pa) em função do volume gasoso injetado, Vb (ml). A resposta do instrumento é linear entre 0 Pa e 70 000 Pa e entre 0 ml e 50 ml de produção gasosa.

▼**M6**

Apêndice 3

Exemplo de uma curva de degradação (aumento líquido de pressão acumulado)



▼M6

Apêndice 4

Exemplo de quadro de dados relativo a um ensaio de biodegradação anaeróbia — quadro da substância em estudo

Laboratório: Substância em estudo: N.º do ensaio:

Temperatura de ensaio: (°C) Volume do espaço livre acima da superfície do líquido (V_h): .....(l) Volume de líquido (V_l): .....(l)

Carbono presente na substância em estudo ($C_{c,v}$): .....(mg/l) m_v [1]: .....(mg)

Dia	p_1 (subst. em estudo) (mbar)	p_2 (subst. em estudo) (mbar)	p_3 (subst. em estudo) (mbar)	p média (subst. em estudo) (mbar)	p_4 (branco) (mbar)	p_5 (branco) (mbar)	p_6 (branco) (mbar)	p média (brancos) (mbar)	p (líquida) média da subst. em estudo — média dos brancos (mbar)	D_p (líquida) acumulada (mbar)	m_h C no espaço livre [2] (mg)	D_h Biodegradação [3] (%)
	$C_{CI,1}$ subst. em estudo (mg)	$C_{CI,2}$ subst. em estudo (mg)	$C_{CI,3}$ subst. em estudo (mg)	C_{CI} média da subst. em estudo (mg)	$C_{CI,4}$ Branco (mg)	$C_{CI,5}$ Branco (mg)	$C_{CI,6}$ Branco (mg)	C_{CI} média dos brancos (mg)	$C_{CI,líquida}$ média da subst. em estudo — média dos brancos (mg)	m_l C no líquido [4] (mg)	m_t C total [5] (mg)	D_t Biodegradação [6] (%)
CI (final)												
pH (final)												

[1] Carbono presente no recipiente de ensaio, m_v (mg): $m_v = C_{C,v} \times V_l$;
[2] Carbono presente no espaço livre acima da superfície do líquido, m_h (mg), à temperatura de incubação normal (35 °C): $m_h = 0{,}468\ \Delta p \times V_h$;
[3] Biodegradação calculada a partir dos gases presentes no espaço livre acima da superfície do líquido, D_h (%): $D_h = (m_h \times 100) / m_v$;
[4] Carbono no líquido, m_l (mg): $m_l = C_{CI,líquida} \times V_l$;
[5] Carbono gaseificado total, m_t (mg): $m_t + m_l$;
[6] Biodegradação total, D_t (%): $D_t = (m_t \times 100) / m_v$.

02008R0440 — PT — 16.10.2019 — 008.001 — 2374

▼M6

Laboratório: ..... Substância de referência: ..... N.º do ensaio: .....

Temperatura de ensaio: (°C) ..... Volume do espaço livre acima da superfície do líquido (V_h): .....(l) Volume de líquido (V_l): .....(l)

Carbono presente na substância de referência ($C_{c,v}$): .....(mg/l) m_v ([1]): (mg)

Dia	p_1 (ref.[a]) (mbar)	p_2 (ref.[a]) (mbar)	p_3 (ref.[a]) (mbar)	p média (ref.[a]) (mbar)	p_4 (inib.) (mbar)	p_5 (inib.) (mbar)	p_6 (inib.) (mbar)	p média (inib.) (mbar)	p (ref.[a]) ref.[a] — branco (mbar)	$D\ p$ (ref.[a]) acumulada (mbar)	m_h C no espaço livre ([2]) (mg)	D_h Biodegradação ([3]) (%)
	$C_{CI,1}$ ref.[a] (mg)	$C_{CI,2}$ ref.[a] (mg)	$C_{CI,3}$ ref.[a] (mg)	C_{CI} média da ref.[a] (mg)	$C_{CI,4}$ inib. (mg)	$C_{CI,5}$ inib. (mg)	$C_{CI,6}$ inib. (mg)	C_{CI} média da inib. (mg)	$C_{CI,líquida}$ ref.[a] — inib. (mg)	m_l C no líquido ([4]) (mg)	m_t C total ([5]) (mg)	D_t Biodegradação ([6]) (%)
CI (final)												
pH (final)												

([1]) Carbono presente no recipiente de ensaio, m_v (mg): $m_v = C_{C,v} \times V_l$;
([2]) Carbono presente no espaço livre acima da superfície do líquido, m_h (mg), à temperatura de incubação normal (35 °C): $m_h = 0{,}468\ \Delta p \times V_h$;
([3]) Biodegradação calculada a partir dos gases presentes no espaço livre acima da superfície do líquido, D_h (%): $D_h = (m_h \times 100) / m_v$;
([4]) Carbono no líquido, m_l (mg): $m_l = C_{CI,líquida} \times V_l$;
([5]) Carbono gaseificado total, m_t (mg): $m_t + m_l$;
([6]) Biodegradação total, D_t (%): $D_t = (m_t \times 100) / m_v$.

▼M6

C.44. LIXIVIAÇÃO EM COLUNAS DE SOLO

INTRODUÇÃO

1. Este método é equivalente ao *Test Guideline* TG 312 (2004) da OCDE. Os produtos químicos produzidos artificialmente podem atingir o solo por via direta, por aplicação deliberada (agroquímicos, por exemplo), ou por vias indiretas (por exemplo através de águas residuais → lamas de depuração → solo ou ar → deposição húmida/seca). Para avaliar os riscos que lhes estão associados, é importante estimar o potencial de transformação destes produtos químicos no solo, bem como de migração (lixiviação) dos mesmos para camadas mais profundas do solo e finalmente para as águas subterrâneas.

2. Existem diversos métodos de medição do potencial de lixiviação de produtos químicos no solo em condições laboratoriais controladas: cromatografia em camada fina de solo, cromatografia em camada espessa de solo, cromatografia em coluna de solo e medições de adsorção-dessorção (1)(2). No caso dos produtos químicos não-ionizados, a determinação do coeficiente de partição *n*-octanol/água (P_{ow}) permite uma primeira estimativa do potencial de adsorção e lixiviação dos mesmos (3)(4)(5).

3. O processo descrito neste método de ensaio baseia-se numa cromatografia de um solo revolvido em coluna de solo (ver a definição no apêndice 1). Realizam-se dois tipos de experiências para determinar o potencial de lixiviação do produto químico em estudo e o potencial de lixiviação dos correspondentes produtos de transformação (estudo com resíduos envelhecidos) nos solos em condições laboratoriais controladas ([1]). O método de ensaio baseia-se em métodos existentes (6)(7)(8)(9)(10)(11).

4. As orientações respeitantes ao número e tipo de solos a utilizar neste método de ensaio são as acordadas na reunião de trabalho da OCDE sobre Seleção de Solos/Sedimentos que decorreu em Belgirate, Itália, em 1995 (12). Nessa reunião de trabalho foram igualmente formuladas recomendações acerca da colheita, manipulação e conservação de amostras de solo para experiências de lixiviação.

PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

5. Enchem-se de solo colunas de uma matéria inerte adequada (vidro, aço inoxidável, alumínio, teflon, PVC etc.). Em seguida, saturam-se com uma solução de chuva artificial (ver a definição no apêndice 1) e deixa-se atingir o equilíbrio, após o que se deixa escoar o excesso de líquido. Seguidamente, trata-se a superfície de cada coluna de solo com o produto químico em estudo e/ou com resíduos envelhecidos deste. Segue-se a aplicação de chuva artificial às colunas de solo e a recolha do lixiviado. Depois de concluída a lixiviação, retira-se o solo das colunas e procede-se ao seccionamento do mesmo no número de segmentos adequado, em função das informações que se pretendam extrair do estudo. Finalmente, pesquisa-se o produto químico em estudo em cada segmento de solo e no lixiviado; se for caso disso, pesquisam-se igualmente os produtos de transformação e outros produtos químicos de interesse.

APLICABILIDADE DO MÉTODO DE ENSAIO

6. Este método de ensaio é aplicável a produtos químicos (não-marcados ou marcados radioativamente, por exemplo com ^{14}C) para os quais se disponha de um método analítico suficientemente exato e sensível. O método não se destina a produtos químicos que sejam voláteis no solo ou na água e que, portanto, não permaneçam no solo e/ou no lixiviado nas condições experimentais do método.

INFORMAÇÕES SOBRE O PRODUTO QUÍMICO EM ESTUDO

7. Podem ser utilizados produtos químicos não-marcados ou marcados radioativamente para medir comportamentos de lixiviação em colunas de solo. São necessárias matérias radioativas para estudar a lixiviação de produtos de transformação (resíduos envelhecidos do produto químico em estudo) e para

([1]) Os estudos de lixiviação em coluna aplicados a produtos fitofarmacêuticos podem fornecer informações sobre a mobilidade do produto químico em estudo e dos produtos de transformação deste e complementar baterias de estudos de sorção.

▼M6

realizar balanços de massa. Recomenda-se a marcação radioativa com ^{13}C, mas outros isótopos (como ^{14}C, ^{15}N, ^{3}H e ^{32}P) podem ser igualmente úteis. Na medida do possível, a marcação deve ser inserida na parte ou partes mais estáveis da molécula. O grau de pureza mínimo do produto químico em estudo é de 95 %.

8. Na sua maior parte, os produtos químicos aplicam-se sob a forma de uma substância. Porém, no caso das substâncias ativas de produtos fitofarmacêuticos, podem ser utilizados produtos formulados para estudar a lixiviação da substância parental, constituindo o ensaio daqueles mesmo um requisito quando for previsível que a mistura afete a taxa de libertação (caso se trate de formulações granuladas ou de libertação regulada, por exemplo). No que respeita à adaptação do protocolo de ensaio especificamente às misturas, pode ser útil consultar as autoridades reguladoras antes de realizar o ensaio. Caso o estudo incida na lixiviação de resíduos envelhecidos, utiliza-se a substância parental em estudo pura.

9. Antes de realizar ensaios de lixiviação em colunas de solo, é preferível dispor das seguintes informações sobre o produto químico em estudo:

   1) Solubilidade em água [método de ensaio A.6] (13);

   2) Solubilidade em solventes orgânicos;

   3) Pressão de vapor [método de ensaio A.4] (13) e constante de Henry;

   4) Coeficiente de partição *n*-octanol/água [métodos de ensaio A.8 e A.24] (13);

   5) Coeficiente de adsorção (K_d, K_f ou K_{CO}) [métodos de ensaio C.18 e/ou C.19] (13);

   6) Hidrólise [método de ensaio C.7] (13);

   7) Constante de dissociação (pK_a) [*Test Guideline* TG 112 da OCDE] (25);

   8) Transformação aeróbia e anaeróbia no solo [método de ensaio C.23] (13).

   Nota: O relatório do ensaio correspondente deve mencionar a temperatura de realização de cada uma destas medições.

10. A quantidade de produto químico em estudo aplicada às colunas de solo deve ser suficiente para a deteção, em cada segmento, de, pelo menos, 0,5 % da dose aplicada. No caso das substâncias ativas de produtos fitofarmacêuticos, a quantidade de produto químico em estudo aplicada pode corresponder à dose máxima recomendada (numa aplicação).

11. É necessário dispor de um método analítico adequado cuja exatidão, precisão e sensibilidade se conheçam para a determinação quantitativa, no solo e no lixiviado, do produto químico em estudo e, se for caso disso, dos produtos de transformação deste. É necessário conhecer igualmente o limite de deteção analítica do produto químico em estudo e dos produtos de transformação significativos deste (normalmente pelo menos todos os produtos de transformação observados em estudos da via de transformação cuja concentração seja ≥10 % da dose aplicada, mas, de preferência, todos os produtos de transformação com interesse) (ver o ponto 17).

▼M6

PRODUTOS QUÍMICOS DE REFERÊNCIA

12. Utilizam-se na avaliação da mobilidade relativa no solo do produto químico em estudo produtos químicos de referência cujo comportamento de lixiviação seja conhecido, por exemplo a atrazina ou o monurão, que podem considerar-se substâncias moderadamente lixiviáveis no terreno (1)(8)(11). A fim de confirmar as propriedades hidrodinâmicas da coluna de solo, também pode ser útil recorrer a um produto químico de referência polar não-sorvente e não-degradável (por exemplo trítio, brometo, fluoresceína ou eosina) para seguir o movimento da água na coluna.

13. O recurso a produtos químicos que constituam padrões analíticos também pode ter utilidade na caracterização e/ou identificação de produtos de transformação presentes nos segmentos de solo e nos lixiviados por métodos cromatográficos ou espetroscópicos ou por outros métodos adequados.

DEFINIÇÕES E UNIDADES

14. Ver o apêndice 1.

CRITÉRIOS DE QUALIDADE

Recuperação

15. A recuperação obtida numa experiência de lixiviação corresponde à soma das percentagens do produto químico em estudo determinadas nos segmentos de solo e no lixiviado da coluna após a lixiviação. Os valores de recuperação devem variar entre 90 % e 110 %, no caso de produtos químicos com marcação radioativa (11), e entre 70 % e 110 %, no caso de produtos químicos sem marcação radioativa (8).

Repetibilidade e sensibilidade do método analítico

16. Pode verificar-se a repetibilidade do método analítico na determinação quantitativa do produto químico em estudo e dos produtos de transformação efetuando uma análise em duplicado do mesmo extrato de um segmento de solo ou de um lixiviado (ver o ponto 11).

17. O limite de deteção do método analítico no tocante ao produto químico em estudo e aos produtos de transformação deve corresponder ao mais baixo dos seguintes critérios: pelo menos 0,01 mg · kg^{-1} em cada segmento de solo ou lixiviado (em termos do produto químico em estudo) ou pelo menos 0,5 % da dose aplicada em qualquer segmento. É igualmente necessário especificar o limite de quantificação (LQ).

DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

Sistema de ensaio

18. Utilizam-se no ensaio colunas de lixiviação (seccionáveis ou não) de uma matéria inerte adequada (por exemplo vidro, aço inoxidável, alumínio, teflon, PVC etc.), com, pelo menos, 4 cm de diâmetro interno e não menos de 35 cm de altura. É necessário verificar se existe alguma interação entre as matérias constituintes das colunas e o produto químico em estudo e/ou os produtos de transformação deste. No apêndice 2 apresentam-se um exemplo adequado de uma coluna seccionável e um exemplo adequado de uma coluna não-seccionável.

19. São necessários colheres, um êmbolo e um vibrador para o enchimento e a compactação das colunas de solo.

20. Para aplicar a chuva artificial às colunas de solo, podem ser utilizados bombas de pistão ou peristálticas, cabeças de chuveiro, frascos de Mariotte ou simples ampolas gotejantes.

▼M6

Equipamento de laboratório e produtos químicos

21. É necessário o equipamento normal de laboratório, designadamente o seguinte:

1) equipamento de análise, tal como aparelhos de cromatografia gás-líquido, HPLC e cromatografia em camada fina, incluindo sistemas adequados de deteção, para a análise de produtos químicos marcados ou não-marcados ou para aplicação do método de diluição isotópica inversa;

2) equipamento de identificação (espetrometria de massa, cromatografia em fase gasosa-espetrometria de massa, HPLC-espetrometria de massa, RMN etc.);

3) contador da cintilação em fase líquida para produtos químicos em estudo com marcação radioativa;

4) dispositivo de oxidação para combustão das matérias com marcação radioativa;

5) equipamento de extração (por exemplo tubos de centrifugação para extração a frio e aparelho de Soxhlet para extração contínua sob refluxo);

6) equipamento para concentração de soluções e de extratos (por exemplo evaporador rotativo).

22. Entre os produtos químicos utilizados contam-se os seguintes: solventes orgânicos de qualidade analítica, tais como acetona, metanol etc.; líquido de cintilação; solução 0,01 M de $CaCl_2$ em água destilada ou desionizada (chuva artificial).

Produto químico em estudo

23. É necessário dissolver em água (destilada ou desionizada) o produto químico em estudo para o aplicar à coluna de solo. Se o produto químico for pouco hidrossolúvel, pode ser aplicado incorporado num produto formulado (se necessário após suspensão ou emulsão em água) ou dissolvido num solvente orgânico. Caso se utilize um solvente orgânico, o volume deste deve ser o mínimo possível e é necessário evaporar o solvente em causa da superfície da coluna de solo antes de iniciar a lixiviação. As formulações sólidas, como os granulados, aplicam-se no estado sólido, sem água. Nesse caso, para melhor distribuição pela superfície da coluna de solo, antes da aplicação pode misturar-se o produto formulado com uma pequena quantidade de areia quartzítica (por exemplo 1 g).

24. A quantidade de produto químico em estudo aplicada às colunas de solo deve ser suficiente para a deteção, em cada segmento, de, pelo menos, 0,5 % da dose aplicada. No caso dos produtos químicos ativos de produtos fitofarmacêuticos, a quantidade de produto químico em estudo aplicada às colunas de solo pode corresponder à dose máxima recomendada (numa aplicação) e, quer se trate da lixiviação da substância parental ou de resíduos envelhecidos, deve ser proporcional à superfície da coluna de solo utilizada ([1]).

Produto químico de referência

25. Utiliza-se um produto químico de referência nas experiências de lixiviação (ver o ponto 12). Aplica-se este à superfície da coluna de solo do mesmo modo que o produto químico em estudo, utilizando uma quantidade que

([1]) Pode calcular-se a quantidade a aplicar a colunas de solo cilíndricas através da seguinte equação:

$$M\ [\mu g] = \frac{A\ [kg/ha] \cdot 10^9 [\mu g/kg] \cdot d^2 [cm^2] \cdot \pi}{10^8 [cm^2/ha] \cdot 4}$$

em que:
M = quantidade aplicada por coluna [µg];
A = taxa de aplicação [$kg \cdot ha^{-1}$];
d = diâmetro da coluna de solo [cm];
π = 3,14.

▼M6

permita detetá-lo convenientemente, seja como padrão interno juntamente com o produto químico em estudo, na mesma coluna de solo, seja isoladamente, noutra coluna de solo. A menos que ambos os produtos químicos estejam marcados do mesmo modo, é preferível aplicá-los na mesma coluna.

Solos

Escolha dos solos

26. Nos estudos de lixiviação com produtos químicos parentais, utilizam-se 3 ou 4 solos com pH, teor de carbono orgânico e textura distintos (12). O quadro 1 contém orientações relativas à escolha de solos para experiências de lixiviação. No caso dos produtos químicos em estudo ionizáveis, os solos escolhidos devem abranger uma faixa de pH larga, a fim de avaliar a mobilidade do produto químico nas formas ionizada e não-ionizada. Nesse caso, pelo menos 3 solos devem ter um pH ao qual o produto químico em estudo se apresente na sua forma móvel.

Quadro 1

Orientações para a escolha de solos para estudos de lixiviação.

N.º do solo	Valor do pH	Carbono orgânico (%)	Teor de argilas (%)	Textura (*)
1	>7,5	3,5 - 5,0	20 - 40	franco-argilosa
2	5,5 - 7,0	1,5 - 3,0	15 - 25	franco-limosa
3	4,0 - 5,5	3,0 - 4,0	15 - 30	franca
4	< 4,0 - 6,0 §	< 0,5 - 1,5 § ‡	< 10 - 15 §	areno-franca
5	< 4,5	> 10 #	< 10	areno-franca/arenosa

(*) Segundo os sistemas da FAO e do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos da América (14).
§ As variáveis correspondentes devem, preferencialmente, apresentar valores das gamas indicadas. Todavia, caso seja difícil encontrar o solo adequado, aceitam-se valores inferiores aos mínimos indicados.
‡ A utilização de solos com teor de carbono orgânico inferior a 0,3 % pode perturbar a correlação entre teor de carbono orgânico e adsorção. Recomenda-se, pois, a utilização de solos cujo teor de carbono orgânico não seja inferior a 0,3 %.
# Os solos com teor de carbono muito elevado (por exemplo >10 %) podem não ser aceitáveis do ponto de vista legal, por exemplo para efeito de registo de pesticidas.

27. Por vezes, é necessário recorrer a outros tipos de solo para representar regiões frias, temperadas ou tropicais. Caso se opte por outros tipos de solo, estes, mesmo que não satisfaçam exatamente os critérios especificados nas orientações para a escolha de solos para estudos de lixiviação (ver o quadro 1 *supra*), devem ser caracterizados pelos mesmos parâmetros e as suas propriedades devem ter o mesmo tipo de variações que os tipos de solo nelas descritos.

28. Nos estudos de lixiviação com resíduos envelhecidos, deve utilizar-se unicamente um tipo de solo (12), com teor de areia superior a 70 % e teor de carbono orgânico compreendido entre 0,5 % e 1,5 % (por exemplo o solo n.º 4 do quadro 1). Pode, porém, ser necessário utilizar mais tipos de solo caso seja importante obter dados sobre os produtos de transformação.

29. É necessário caracterizar todos os solos, pelo menos, em termos de textura [percentagem de areias, de limos e de argilas segundo os sistemas de classificação da FAO e do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos da América (14)], pH, capacidade de permuta catiónica, teor de carbono orgânico, densidade aparente (no caso dos solos revolvidos) e capacidade de

▼M6

retenção de água. A medição da biomassa microbiana apenas é necessária no caso dos solos utilizados no período de envelhecimento/incubação que precede os ensaios de lixiviação com resíduos envelhecidos. Para a interpretação dos resultados deste estudo, pode ser útil dispor de informações sobre outras propriedades do solo (por exemplo classificação do solo, mineralogia das argilas ou superfície específica). Para determinar as características do solo, podem ser utilizados os métodos recomendados nas referências (15)(16)(17)(18)(19).

Colheita e conservação de amostras de solos

30. Colhem-se as amostras de solo na camada superior (horizonte A), até à profundidade máxima de 20 cm. Removem-se os vestígios de vegetação, a macrofauna e as pedras. Secam-se as amostras de solo (exceto as destinadas ao envelhecimento do produto químico em estudo) ao ar, à temperatura ambiente (de preferência entre 20 °C e 25 °C). As forças de desagregação aplicadas devem ser as mínimas possíveis, de modo a manter, tanto quanto possível, a textura original do solo. Peneiram-se as amostras de solo através de uma malha ≤2 mm. Recomenda-se uma homogeneização cuidadosa, de modo a aumentar a reprodutibilidade dos resultados. Antes de serem utilizadas, as amostras de solo podem ser conservadas à temperatura ambiente, secas ao ar (12). Não se recomenda nenhum período-limite de armazenagem; contudo, no caso das amostras de solo armazenadas há mais de três anos, deve voltar a determinar-se o teor de carbono orgânico e o pH antes da utilização.

31. Deve dispor-se de informação pormenorizada sobre a história do local de colheita das amostras de solo, designadamente: localização exata [definida com exatidão pela Projeção Universal Transversa de Mercator (UTM)/Dados Horizontais Europeus ou por coordenadas geográficas], coberto vegetal, tratamentos com produtos fitofarmacêuticos, tratamentos com fertilizantes biológicos ou minerais, adições de matérias biológicas e contaminações acidentais (12). Não devem ser utilizados em estudos de lixiviação solos que tenham sido tratados com o produto químico em estudo ou com análogos estruturais deste nos quatro anos anteriores.

Condições de realização do ensaio

32. Durante o ensaio, é necessário manter as colunas de solo destinadas à lixiviação na obscuridade e à temperatura ambiente, sendo que esta não deve variar mais de ±2 °C. Recomendam-se temperaturas entre 18 °C e 25 °C.

33. Aplica-se continuamente chuva artificial (solução 0,01 M de $CaCl_2$) na superfície de cada coluna de solo à razão de 200 mm num período de 48 horas ([1]), que corresponde à aplicação de 251 ml numa coluna com diâmetro interno de 4 cm. Se o objetivo do ensaio o exigir, podem ser adicionalmente utilizadas outras taxas de aplicação da chuva artificial e períodos mais longos.

Realização do ensaio

Lixiviação de um produto químico parental

34. Enchem-se pelo menos duas colunas de lixiviação (duplicado) com solo não-tratado, seco ao ar e peneirado (<2 mm) até cerca de 30 cm de altura. Para que o enchimento seja uniforme, adiciona-se o solo às colunas em pequenas quantidades com uma colher e compacta-se o solo com um êmbolo, enquanto se faz vibrar suavemente a coluna, até que a parte superior da coluna de solo deixe de afundar. Para que os resultados obtidos com as colunas de

([1]) Simula-se assim uma precipitação extremamente elevada. Por exemplo, a precipitação média na Europa Central é da ordem de 800-1 000 mm anuais.

▼M6

lixiviação sejam reprodutíveis, é necessário que os enchimentos sejam uniformes. As referências (20), (21) e (22) descrevem em pormenor técnicas de enchimento de colunas. Para garantir a reprodutibilidade do processo de enchimento determina-se o peso total do solo introduzido em cada coluna ([1]), sendo que o peso de solo deve ser o mesmo em cada coluna do duplicado utilizado.

35. Após o enchimento, humedecem-se as colunas de solo com chuva artificial (solução 0,01 M de $CaCl_2$) da base para o topo, para que o ar retido nos poros do solo seja desalojado pela água. Em seguida, deixa-se que as colunas de solo atinjam o equilíbrio e escoa-se por gravidade o excesso de água. A referência (23) recapitula vários métodos de saturação de colunas.

36. A seguir, aplica-se nas colunas de solo o produto químico em estudo e/ou o produto químico de referência (ver igualmente os pontos 23 a 25). Para obter uma distribuição homogénea, aplicam-se as soluções, suspensões ou emulsões do produto químico em estudo e/ou do produto químico de referência uniformemente na superfície das colunas de solo. Caso a incorporação no solo seja a forma recomendada de aplicação de um determinado produto químico em estudo, este deve ser misturado com uma pequena quantidade de solo (por exemplo 20 g), depositando-se em seguida a mistura na superfície da coluna de solo.

37. Cobre-se então a superfície de cada uma das colunas de solo com um disco de vidro sinterizado, esférulas de vidro, um filtro de fibra de vidro ou um disco de papel de filtro, de modo a distribuir a chuva artificial uniformemente pela superfície do solo e para que esta não seja perturbada pelas gotas de chuva. Quanto maior for o diâmetro da coluna, maior cuidado haverá que ter com a aplicação da chuva artificial nas colunas de solo, de modo a distribuí-la uniformemente pela superfície do solo. A seguir, adiciona-se a chuva artificial gota a gota às colunas de solo, recorrendo a uma bomba de êmbolo, a uma bomba peristáltica ou a uma ampola gotejante. De preferência, recolhe-se o lixiviado de cada coluna em frações e registam-se os volumes correspondentes ([2]).

38. Após a lixiviação e o escoamento das colunas, seccionam-se as colunas de solo num número de segmentos adequado, em função das informações a obter no estudo, procede-se à extração dos segmentos com solventes ou misturas de solventes adequados e efetuam-se as análises com vista à determinação do produto químico em estudo e, se for caso disso, dos produtos de transformação, da radioatividade total e do produto químico de referência. Analisam-se os mesmos produtos nos lixiviados ou frações de lixiviados diretamente ou depois de estes serem sujeitos a extração. Caso se estude um produto químico com marcação radioativa, é necessário identificar todas as frações que contenham ≥10 % da radioatividade aplicada.

Lixiviação de resíduos envelhecidos

39. Trata-se solo fresco (não sujeito anteriormente a secagem ao ar) com uma dose do produto químico em estudo marcado radioativamente proporcional à superfície da coluna de solo (ver o ponto 24) e incuba-se em condições aeróbias de acordo com o método de ensaio C.23 (13). A duração do período de incubação (envelhecimento) deve ser suficiente para que sejam geradas

([1]) Exemplos de densidades aparentes de solos revolvidos:solo arenoso: 1,66 g · ml^{-1};
solo areno-franco: 1,58 g · ml^{-1};
solo franco: 1,17 g · ml^{-1};
solo limoso: 1,11 g · ml^{-1}.

([2]) No caso das colunas de solo com 4 cm de diâmetro e 30 cm de comprimento, o volume de lixiviados varia normalmente entre 230 ml e 260 ml, correspondentes a aproximadamente 92 % a 104 % do volume total de chuva artificial aplicado (251 ml).

▼M6

quantidades significativas dos produtos de transformação; recomenda-se um período de envelhecimento correspondente à meia-vida do produto químico em estudo ([1]), com um máximo de 120 dias. Antes da lixiviação, analisa-se o solo envelhecido para determinar o produto químico em estudo e os produtos de transformação deste.

40. Enchem-se as colunas de lixiviação até 28 cm de altura, com o mesmo solo (mas seco ao ar) utilizado no envelhecimento, conforme se descreveu no ponto 34, determinando-se também o peso total das colunas de solo cheias. Em seguida, humedecem-se as colunas de solo como se descreveu no ponto 35.

41. Aplicam-se então o produto químico em estudo e os seus produtos de transformação na superfície das colunas de solo sob a forma de resíduos no solo envelhecidos (ver o ponto 39), de modo a formar um segmento de solo com 2 cm de espessura. De preferência, a altura total das colunas de solo (solo não-tratado + solo envelhecido) não deve exceder 30 cm (ver o ponto 34).

42. Efetua-se a lixiviação como se descreveu no ponto 37.

43. Após a lixiviação, analisam-se os segmentos de solo e os lixiviados como se indicou no ponto 38, a fim de determinar o produto químico em estudo, os produtos de transformação deste e a radioatividade não-extraída. Para que possa determinar-se a quantidade de resíduo envelhecido que, após a lixiviação, permanece na camada superior com 2 cm de espessura, analisa-se separadamente este segmento.

DADOS E RELATÓRIOS

Tratamento dos resultados

44. As quantidades de produto químico em estudo, produtos de transformação, produtos não-extraíveis e, se for caso disso, produto químico de referência são indicadas em percentagem da dose inicial aplicada, por segmento de solo e por fração de lixiviado. Traça-se uma representação gráfica por coluna com indicação das percentagens determinadas em função da profundidade no solo.

45. Caso o estudo de lixiviação em coluna compreenda um produto químico de referência, pode avaliar-se a lixiviação de produtos químicos numa escala relativa por recurso a fatores de mobilidade relativa (FMR; ver a definição no apêndice 3) (1)(11), que permitem comparar dados de lixiviação de vários produtos químicos obtidos com diferentes tipos de solo. Constam do apêndice 3 vários exemplos de valores de FMR para diversos produtos fitofarmacêuticos.

46. É igualmente possível obter estimativas de K_{co} (coeficiente normalizado de adsorção de carbono orgânico) e de K_{mo} (coeficiente normalizado de repartição de matéria orgânica) a partir de resultados de lixiviação em coluna, com base na distância média de lixiviação ou em correlações estabelecidas entre o FMR e K_{co} ou K_{mo} (4) ou por aplicação de teoria cromatográfica simples (24). Este último método deve, porém, ser utilizado com prudência, sobretudo tendo em atenção que o processo de lixiviação não decorre unicamente em condições de saturação, caracterizando-se os sistemas mais por condições de insaturação.

([1]) Pode formar-se no solo mais do que um produto de transformação importante, podendo cada um desses produtos formar-se em períodos diferentes do estudo de transformação. Nesses casos, pode ser necessário efetuar estudos de lixiviação com resíduos envelhecidos de idades diferentes.

▼M6

Interpretação dos resultados

47. Os estudos de lixiviação em coluna descritos neste método permitem determinar o potencial de lixiviação ou de mobilidade no solo do produto químico em estudo (no estudo de lixiviação da substância parental) e/ou dos produtos de transformação deste (no estudo de lixiviação de resíduos envelhecidos). Estes ensaios não permitem prever quantitativamente comportamentos de lixiviação no terreno, mas podem ser utilizados para comparar a lixiviabilidade de um produto químico com a de outros, dos quais se conheça o comportamento de lixiviação (24). Analogamente, também não permitem quantificar a percentagem do produto químico aplicado que é suscetível de atingir as águas subterrâneas (11). Todavia, no caso dos produtos químicos que revelem elevado potencial de mobilidade nos ensaios laboratoriais, os resultados dos estudos de lixiviação em coluna podem orientar a decisão de realizar ou não ensaios adicionais no terreno ou parcialmente no terreno.

Relatório do ensaio

48. Elementos a constar do relatório do ensaio:

Produto químico em estudo e produto químico de referência (quando utilizado)

— denominação comum, denominação química (nomenclaturas IUPAC e CAS), número CAS, estrutura química (indicando a localização do marcador, caso se utilize marcação radioativa) e propriedades físico-químicas pertinentes;

— grau de pureza do produto químico em estudo (presença de impurezas);

— pureza radioquímica do produto químico marcado e atividade específica (se for caso disso).

Solos utilizados no ensaio

— elementos relativos ao local de colheita das amostras de solo;

— propriedades do solo tais como o pH, o teor de carbono orgânico, o teor de argila, a textura e a densidade aparente (no caso dos solos revolvidos);

— atividade microbiana do solo (apenas no caso do solo utilizado para envelhecer o produto químico em estudo);

— duração e condições da conservação de amostras de solo.

Condições de realização do ensaio

— datas da realização dos estudos;

— comprimento e diâmetro das colunas de lixiviação;

— peso total do solo das colunas;

— quantidade de produto químico em estudo aplicada e, se for caso disso, do produto químico de referência aplicado.

— quantidade, frequência e duração da aplicação de chuva artificial;

— temperatura do dispositivo experimental;

— número de replicados (pelo menos dois);

— métodos de análise do produto químico em estudo, dos produtos de transformação e, se for caso disso, do produto químico de referência nos vários lixiviados e segmentos de solo;

— métodos de caracterização e de identificação dos produtos de transformação nos lixiviados e nos segmentos de solo.

▼**M6**

Resultados do ensaio

— quadros dos resultados correspondentes aos lixiviados e aos segmentos de solo, expressos em concentração e em percentagem da dose aplicada;

— balanço de massa, se for caso disso;

— volume dos lixiviados;

— distâncias de lixiviação e, se for caso disso, fatores de mobilidade relativa;

— representação gráfica da percentagem detetada nos segmentos de solo em função da profundidade do segmento de solo;

— discussão e interpretação dos resultados.

REFERÊNCIAS

1) Guth, J.A., Burkhard, N., Eberle, D.O. (1976). Experimental Models for Studying the Persistence of Pesticides in Soil. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides.

2) Russel, M.H. (1995). Recommended approaches to assess pesticide mobility in soil. *In* Progress in Pesticide Biochemistry and Toxicology, volume 9 (Environmental Behaviour of Agrochemicals — Roberts, T.R., Kearney, P.C., editores). J. Wiley & Sons.

3) Briggs, G.G. (1981). Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficient, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. *J. Agric. Food Chem.*, 29, 1050-1059.

4) Chiou, C.T., Porter, P.E., Schmedding, D.W. (1983). Partition equilibria of non-ionic organic compounds between soil organic matter and water. *Environ. Sci. Technol.*, 17, 227-231.

5) Guth, J.A. (1983). Untersuchungen zum Verhalten von Pflanzenschutzmitteln im Boden. *Bull. Bodenkundliche Gesellschaft Schweiz*, 7, 26-33.

6) US Environmental Protection Agency (1982). Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.

7) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate Guidelines for registration of pesticides in Canada.

8) Anexo I da Diretiva 95/36/CE da Comissão, de 14 de julho de 1995, que altera a Diretiva 91/414/CEE relativa à colocação dos produtos fitofarmacêuticos no mercado (JO L 172 de 22.7.1995, p. 8).

9) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1991). Application for registration of a pesticide. Secção G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

10) BBA (1986). Richtlinie für die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, parte IV, 4-2. Versickerungsverhalten von Pflanzenschutzmitteln.

11) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, editor.

12) OCDE (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/ /Sediments. Belgirate, Itália, 18-20 de janeiro de 1995.

13) Os seguintes capítulos deste anexo:

Capítulo A.4 — Pressão de vapor;

Capítulo A.6 — Solubilidade em água;

▼**M6**

Capítulo A.8 — Coeficiente de partição: método do «frasco agitado»;

Capítulo A.24 — Coeficiente de partição: método por HPLC;

Capítulo C.7 — Degradação — Degradação abiótica: hidrólise em função do pH;

Capítulo C.18 — Adsorção/dessorção por recurso a um método de equilíbrio por lotes de solos;

Capítulo C.23 — Transformações aeróbias e anaeróbias no solo.

14) Soil Texture Classification (US and FAO systems). *Weed Science*, 33, suplemento 1 (1985) e *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 26, 305 (1962).

15) Methods of Soil Analysis (1986). Parte 1, Physical and Mineralogical Methods (Klute, A., editor). Agronomy Series, n.º 9, 2.ª edição.

16) Methods of Soil Analysis (1982). Parte 2, Chemical and Microbiological Properties (Page, A.L., Miller, R.H., Kelney, D.R., editores). Agronomy Series, n.º 9, 2.ª edição.

17) ISO Standard Compendium Environment (1994). Soil Quality — General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. Primeira Edição.

18) Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt am Main.

19) Scheffer, F., Schachtschabel, P. (1998). Lehrbuch der Bodenkunde. F. Enke Verlag, Estugarda.

20) Weber, J.B., Peeper, T.F. (1977). *In* Research Methods in Weed Science, 2.ª edição (Truelove, B., editor). *Soc. Weed Sci.*, Auburn, Alabama, 73-78.

21) Weber, J.B., Swain, L.R., Strek, H.J., Sartori, J.L. (1986). *In* Research Methods in Weed Science, 3.ª edição (Camper, N.D., editor). *Soc. Weed Sci.*, Champaign, IL, 190-200.

22) Oliveira, *et al.* (1996). Packing of sands for the production of homogeneous porous media. *Soil Sci. Soc. Amer. J.*, 60(1):49-53.

23) Shackelford, C.D. (1991). Laboratory diffusion testing for waste disposal — A review. *J. Contam. Hydrol.*, 7, 177-217.

24) Hamaker, J.W. (1975). Interpretation of soil leaching experiments. *In* Environmental Dynamics of Pesticides (Haque, R., Freed, V.H., editores), 115--133. Plenum Press, Nova Iorque.

25) OCDE (1981). Dissociation constants in water. OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 4112. OCDE, Paris.

▼M6

Apêndice 1

Definição e unidades

Resíduo no solo envelhecido: Produto químico em estudo e produtos de transformação deste presentes no solo após a aplicação, decorrido um período suficientemente longo para que os processos de transporte, adsorção, metabolismo e dissipação possam alterar a distribuição e a natureza química de parte do produto químico aplicado (1).

Chuva artificial: Solução 0,01 M de $CaCl_2$ em água destilada ou desionizada.

Distância média de lixiviação: Fundo da secção do solo na qual a recuperação acumulada do produto químico corresponde a 50 % do produto químico em estudo recuperado total [experiência de lixiviação normal] ou (fundo da secção do solo na qual a recuperação acumulada do produto químico corresponde a 50 % do produto químico em estudo recuperado total) — (espessura da camada de resíduos envelhecidos)/2 [estudo de lixiviação de resíduos envelhecidos].

Produto químico: Substância ou mistura.

Lixiviado: Fase aquosa após percolação através de um perfil de solo ou de uma coluna de solo (1).

Lixiviação: Processo de migração de um produto químico para baixo num perfil de solo ou numa coluna de solo (1).

Distância de lixiviação: Segmento mais profundo do solo no qual, após o processo de lixiviação, se encontra ≥ 0,5 % do produto químico em estudo aplicado ou do resíduo envelhecido (equivale à profundidade de penetração).

Limite de deteção (LD) e **limite de quantificação (LQ)**: o limite de deteção (LOD) é a concentração de um produto químico abaixo da qual a identidade do mesmo não pode ser distinguida dos artefactos analíticos. O limite de quantificação (LQ) é a concentração de um produto químico abaixo da qual a concentração do mesmo não pode ser determinada com exatidão aceitável.

Fator de mobilidade relativa (FMR): [distância de lixiviação do produto químico em estudo (cm)] / [distância de lixiviação do produto químico de referência (cm)].

Produto químico em estudo: Qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado este método de ensaio.

Produto de transformação: Todos os produtos químicos resultantes de reações de transformação bióticas ou abióticas do produto químico em estudo, incluindo CO_2 e produtos ligados aos resíduos.

Solo: Mistura de componentes químicos minerais e orgânicos (compreendo estes últimos compostos com teor elevado de carbono e de azoto e peso molecular elevado) povoada de pequenos organismos, maioritariamente microrganismos. O solo pode apresentar-se em dois estados distintos:

— não-revolvido, tal como se desenvolveu ao longo do tempo, com as camadas características dos vários tipos de solo;

— revolvido, tal como é normalmente encontrado nas terras aráveis ou como se apresenta quando a recolha de amostras para utilização no presente método de ensaio é feita por escavação (2).

1) Holland, P.T. (1996). Glossary of Terms Relating to Pesticides. IUPAC Reports on Pesticide (36). *Pure & Appl. Chem.*, 68, 1167-1193.

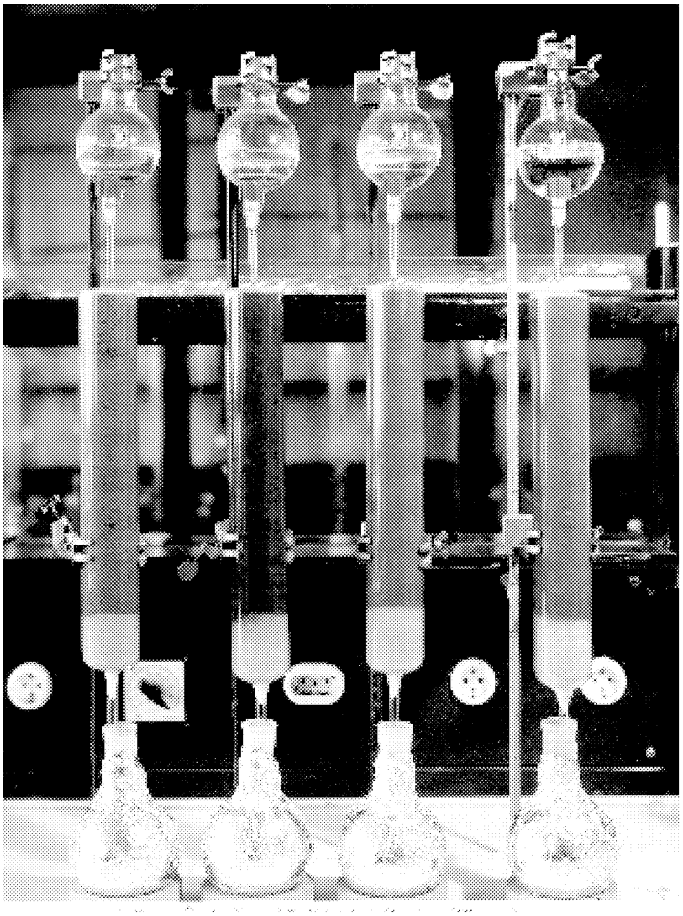
2) OECD Test Guideline 304 A: Inherent Biodegradability in Soil (adotado a 12 de maio de 1981).

▼M6

Apêndice 2

Figura 1:

Exemplo de colunas de vidro não-seccionáveis de lixiviação com 35 cm de comprimento e 5 cm de diâmetro interno (1).



←Ampolas gotejantes para aplicação de chuva artificial

← Disco de vidro sinterizado para evitar perturbações da superfície do solo e distribuir uniformemente a chuva artificial

← Coluna de vidro cheia do solo ensaiado (quando se ensaiam produtos fotolábeis, é necessário proteger as colunas com folha de alumínio)

← Camada de areia quartzítica

← Tampão de fibra de vidro para retenção do solo na coluna

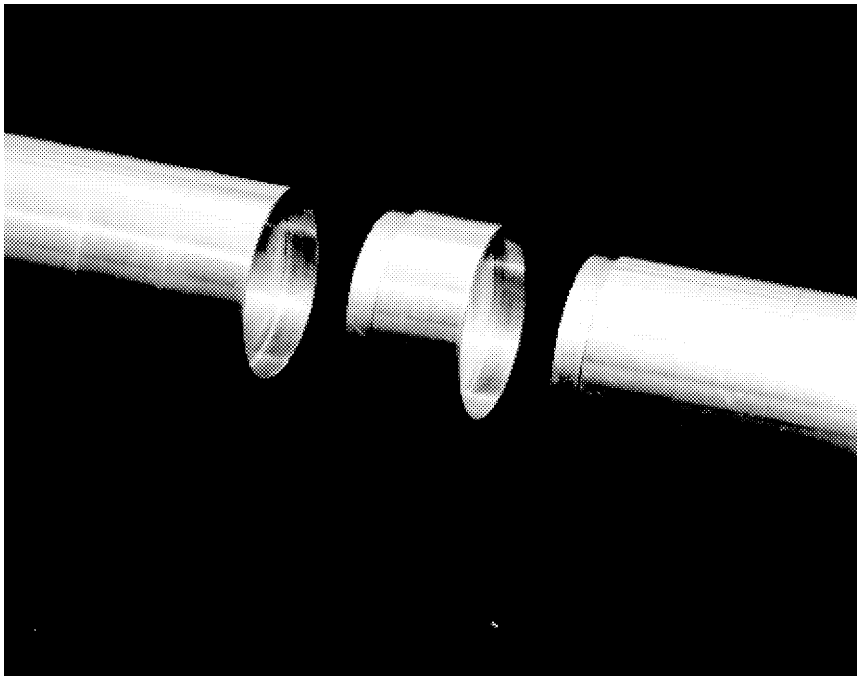
← Balão de fundo redondo para recolha do lixiviado, envolvido em folha de alumínio para impedir a fotólise

1) Drescher, N. (1985). Moderner Acker- und Pflanzenbau aus Sicht der Pflanzenschutzmittelindustrie. *In* Unser Boden — 70 Jahre Agrarforschung der BASF AG, 225-236. Verlag Wissenschaft und Politik, Colónia.

▼**M6**

Figura 2:

Exemplo de uma coluna metálica seccionável com 4 cm de diâmetro interno (1).



1) Burkhard, N., Eberle D.O., Guth, J.A. (1975). Model systems for studying the environmental behaviour of pesticides. *Environmental Quality and Safety*, Suppl. Vol. III, 203-213.

▼**M6**

Apêndice 3

Exemplos de fatores de mobilidade relativa (*) (FMR) correspondentes a diversos produtos fitofarmacêuticos (1)(2) e respetivas classes de mobilidade (+)

Intervalo do FMR	Produto químico (FMR)	Classe de mobilidade
≤ 0,15	Paratião (< 0,15), flurodifena (0,15)	Iimóvel
0,15 — 0,8	Profenofos (0,18), propiconazol (0,23), diazinão (0,28), diurão (0,38), terbutilazina (0,52), metidatião (0,56), prometrina (0,59), propazina (0,64), alacloro (0,66), metolacloro (0,68)	II ligeiramente móvel
0,8 — 1,3	Monurão (**) (1,00), atrazina (1,03), simazina (1,04), fluometurão (1,18)	III moderadamente móvel
1,3 — 2,5	Prometão (1,67), cianazina (1,85), bromacil (1,91), carbutilato (1,98)	IV bastante móvel
2,5 — 5,0	Carbofurão (3,00), dioxacarbe (4,33)	V móvel
> 5,0	Monocrotofos (> 5,0), dicrotofos (> 5,0)	VI muito móvel

(*) O fator de mobilidade relativa calcula-se do seguinte modo:

$$FMR = \frac{\text{distância de lixiviação do produto químico em estudo(cm)}}{\text{distância de lixiviação do produto químico de referência(cm)}}$$

(**) Produto químico de referência.

\+ Outros sistemas de classificação da mobilidade de produtos químicos no solo baseiam-se em valores de R_f de cromatografia em camada fina de solo \big(4) e valores de K_{co} (5)(6).

1) Guth, J.A. (1985). Adsorção/dessorção *In* Joint International Symposium «Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment». Canterbury, Reino Unido, 1-3 de julho de 1985.

2) Guth, J.A., Hörmann, W.D. (1987). Problematik und Relevanz von Pflanzenschutzmittel-Spuren im Grund (Trink-) Wasser. *Schr. Reihe Verein WaBoLu*, 68, 91-106.

3) Harris, C.I. (1967). Movement of herbicides in soil. *Weeds*,15, 214-216.

4) Helling, C.S. (1971). Pesticide mobility in soils. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, 35, 743-748.

5) McCall, P.J., Laskowski, D.A., Swann, R.L., Dishburger, H.J. (1981). Measurements of sorption coefficients of organic chemicals and their use in environmental fate analysis. *In* Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants. Proceedings of AOAC Symposium, AOAC, Washington D.C.

6) Hollis, J.M. (1991). Mapping the vulnerability of aquifers and surface waters to pesticide contamination at the national/regional scale. BCPC Monograph No. 47, Pesticides in Soil and Water, 165-174.

▼M6

C.45. ESTIMATIVA DAS EMISSÕES PARA O AMBIENTE DE MADEIRAS TRATADAS COM PRODUTOS DE PRESERVAÇÃO DA MADEIRA: MÉTODO LABORATORIAL PARA ARTIGOS DE MADEIRA SEM COBERTURA E EM CONTACTO COM ÁGUA DOCE OU COM ÁGUA DO MAR

INTRODUÇÃO

1. Este método é equivalente ao *Test Guideline* TG 313 (2007) da OCDE. Para que possam avaliar-se os riscos para o ambiente decorrentes das madeiras tratadas é necessário quantificar as emissões para o ambiente das madeiras tratadas com produtos de preservação da madeira. Este protocolo de ensaio descreve um método laboratorial de estimativa das emissões de madeiras tratadas com produtos de preservação da madeira em duas situações suscetíveis de gerar emissões para o ambiente:

   — provenientes de madeira tratada em contacto com água doce, caso em que a superfície da madeira pode gerar emissões para a água doce;

   — provenientes de madeira tratada em contacto com água do mar, caso em que a superfície da madeira pode gerar emissões para a água do mar.

2. Este método de ensaio destina-se a ser aplicado às emissões provenientes de madeiras e de artigos de madeira sem cobertura e que entram em contacto com água doce ou com água do mar. Foram estabelecidas a nível internacional classes de utilização que definem as categorias dos perigos biológicos aos quais os artigos tratados estão sujeitos. As classes de utilização também definem as situações nas quais os artigos tratados são utilizados e delimitam os compartimentos ambientais (atmosfera, águas, solo) potencialmente colocados em risco pelas madeiras tratadas com produtos de preservação da madeira.

3. Este método de ensaio constitui um protocolo laboratorial para a obtenção de amostras da água (emissado) na qual é imersa a madeira tratada, a intervalos crescentes após a exposição. Relaciona-se a quantidade emitida para o emissado com a superfície da madeira e a duração da exposição, a fim de determinar um fluxo em mg/m^2/dia. Pode assim estimar-se o fluxo (taxa de lixiviação) após períodos crescentes de exposição.

4. As quantidades emitidas podem ser utilizadas na avaliação dos riscos para o ambiente associados à madeira tratada.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

5. Considera-se que o mecanismo de lixiviação da superfície da madeira por água doce não é idêntico, em termos de natureza e intensidade, ao mecanismo de lixiviação da superfície da madeira por água salgada. Por conseguinte, é necessário um estudo de lixiviação da madeira por água do mar aplicável aos produtos ou misturas de preservação da madeira destinados ao tratamento de madeiras utilizadas nas proximidades do mar.

6. A madeira utilizada num estudo de madeiras tratadas com produtos de preservação da madeira deve ser representativa das madeiras comercializadas e ser tratada de acordo com as instruções do fabricante do produto de preservação e em observância das normas e especificações pertinentes. É ainda necessário especificar os parâmetros do condicionamento a realizar à madeira após o tratamento, antes de iniciar o ensaio.

7. As amostras de madeira utilizadas devem ser representativas dos artigos existentes (designadamente no tocante a espécies, densidade e outras características).

▼M6

8. O ensaio é aplicável a madeiras tratadas por processos penetrantes ou de aplicação superficial e a madeiras tratadas sujeitas a um tratamento de superfície obrigatório adicional (por exemplo pintura exigida para a utilização comercial da madeira).

9. A composição, a quantidade, o pH e o estado físico da água são importantes para determinar a quantidade, o teor e a natureza das emissões de uma madeira.

PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

10. Para a realização do ensaio, mergulham-se em água provetes de madeira tratada com o produto de preservação da madeira. Recolhem-se e analisam-se quimicamente amostras sucessivas da água (emissado) ao longo do período de exposição, as vezes necessárias para efetuar cálculos estatísticos. A partir dos resultados das análises, calculam-se as taxas de emissão em mg/m^2/dia. Regista-se o período decorrido até à colheita de cada amostra. Os ensaios com amostras de madeiras não-tratadas podem ser interrompidos caso não se detetem níveis de fundo nos três primeiros pontos de dados.

11. A inclusão no ensaio de provetes de madeira não-tratada permite determinar, nos emissados, os níveis de fundo associados à madeira em causa, não provenientes do produto de preservação utilizado.

CRITÉRIOS DE QUALIDADE

Exatidão

12. A exatidão do método de ensaio na estimativa de emissões depende da representatividade dos provetes ensaiados relativamente à madeira tratada comercializada, da representatividade da água utilizada relativamente à água real e da representatividade do regime de exposição relativamente às condições naturais.

13. Antes de realizar o ensaio, é necessário determinar a exatidão, a precisão e a repetibilidade do método analítico.

Reprodutibilidade

14. Colhem-se e analisam-se três amostras de água e toma-se o correspondente valor médio como valor da emissão. A reprodutibilidade inter e intralaboratorial dos resultados depende do regime de imersão e da madeira que constitui os provetes ensaiados.

Latitude aceitável dos resultados

15. A latitude dos resultados do ensaio é aceitável se a diferença entre os valores máximo e mínimo for inferior a uma ordem de grandeza.

CONDIÇÕES DE REALIZAÇÃO DO ENSAIO

Água

16. Cenários de lixiviação por água doce: Quando se pretende avaliar a exposição de madeira a água doce, recomenda-se a utilização de água desionizada (por exemplo ASTM D 1193, tipo II) no ensaio de lixiviação. A temperatura da água deve ser de 20 °C +/- 2 °C; os valores medidos do pH e da temperatura da água devem constar do relatório do ensaio. A análise de amostras da água utilizada, colhidas antes da imersão dos provetes tratados, permite estimar depois o teor dos produtos químicos analisados na água. Trata-se de análises de controlo que permitem determinar os níveis de fundo dos produtos químicos analisados em seguida.

▼M6

17. Cenários de lixiviação por água do mar: Quando se pretende avaliar a exposição de madeira a água do mar, recomenda-se a utilização de água artificial (por exemplo ASTM D 1141, sucedânea da água do mar, sem metais pesados) no ensaio de lixiviação. A temperatura da água deve ser de 20 °C +/- 2 °C; os valores medidos do pH e da temperatura da água devem constar do relatório do ensaio. A análise de amostras da água utilizada, colhidas antes da imersão dos provetes tratados, permite estimar depois o teor dos produtos químicos analisados na água. Trata-se de análises de controlo que permitem determinar os níveis de fundo dos produtos químicos importantes.

Provetes de madeira ensaiados

18. Para que o ensaio dos produtos de preservação da madeira seja eficaz, a espécie de madeira ensaiada deve ser representativa das espécies habitualmente utilizadas. As espécies recomendadas são a *Pinus sylvestris* L. (pinheiro da escócia), a *Pinus resinosa* Ait. (pinheiro vermelho) e o pinheiro americano dito *Southern pine* (*Pinus spp*). Podem ser realizados ensaios adicionais com outras espécies.

19. Deve utilizar-se madeira com fio direito, sem nós e sem aspeto resinoso. A madeira utilizada deve ser representativa das madeiras comercializadas. Registam-se a proveniência, a densidade e o número de anéis anuais por 10 mm.

20. Recomenda-se a utilização no ensaio de séries de cinco provetes de madeira constituídos por blocos de dimensões conformes com a norma europeia EN 113 (25 mm × 50 mm × 15 mm) e faces longitudinais paralelas ao fio da madeira, embora possam utilizar-se outras dimensões (por exemplo 50 mm × 150 mm × 10 mm). Mergulham-se completamente na água os provetes ensaiados. Os provetes devem ser constituídos exclusivamente por alburno. Identifica-se individualmente cada provete, a fim de poder identificá-lo ao longo do ensaio.

21. Os provetes devem apresentar-se aplanados ou cortados em planos, mas não lixados.

22. Utilizam-se nas análises efetuadas durante o ensaio pelo menos cinco séries de provetes de madeira: tratam-se três séries com o produto de preservação da madeira, uma não se trata e a outra serve para estimar o teor de humidade antes do tratamento, determinado por secagem em estufa, dos provetes ensaiados. Prepara-se para o ensaio um número de provetes suficiente para se selecionarem três séries de provetes cuja retenção do produto de preservação da madeira não se afaste mais de 5 % do valor médio desse parâmetro no conjunto dos provetes preparados para o ensaio.

23. Procede-se à selagem das extremidades de cada provete com um produto químico que impeça tanto a penetração do produto de preservação da madeira pelas faces transversais dos provetes como a lixiviação destes pela mesma zona. Ao aplicar o agente selante das extremidades, há que distinguir os provetes correspondentes a processos de aplicação superficial dos provetes correspondentes a processos de aplicação penetrante. O agente selante só tem de ser aplicado antes do tratamento no caso dos processos de aplicação superficial.

24. No caso dos tratamentos por processos de penetração, as faces transversais dos provetes têm de estar expostas. Por conseguinte, neste caso, as extremidades dos provetes só podem ser seladas após o período de condicionamento. Estimam-se as emissões apenas para as superfícies longitudinais. Verificam-se e, se necessário, reaplicam-se as selagens antes de dar início à lixiviação, não podendo aplicar-se selantes depois desta iniciada.

▼M6

Recipiente de imersão

25. Este recipiente deve ser de material inerte e suficientemente grande para nele caberem 5 provetes de madeira conformes com a norma EN 113 mergulhados em 500 ml de água, sendo a razão entre a superfície da madeira e o volume de água de 0,4 cm^2/ml.

Suporte para ensaio dos provetes

26. Dispõem-se os provetes utilizados no ensaio num suporte que permita o contacto com a água de todas as superfícies expostas dos provetes.

PROTOCOLO DO TRATAMENTO POR APLICAÇÃO DE UM PRODUTO DE PRESERVAÇÃO DA MADEIRA

Preparação dos provetes tratados a utilizar no ensaio

27. Para realizar o ensaio, tratam-se os provetes de madeira com o produto de preservação em estudo pelo método especificado para este último, ou seja, por um processo de tratamento penetrante ou por um processo de aplicação superficial, que pode ser por imersão, pulverização ou pincelagem.

Produtos de preservação a aplicar por processos de tratamento penetrantes

28. Prepara-se uma solução do produto de preservação que permita atingir a absorção ou retenção especificada após aplicação da solução pelo processo de tratamento penetrante. Pesa-se cada provete de madeira destinado ao ensaio e determinam-se, por medição, as dimensões do provete. O processo de tratamento penetrante a utilizar é o especificado para a aplicação do produto de preservação à madeira tendo em vista as classes de utilização 4 ou 5. Após o tratamento, volta a pesar-se cada provete e calcula-se a retenção do produto de preservação (em kg/m^3) por meio da seguinte equação:

$$\frac{\text{Massa após o tratamento(kg)} - \text{Massa antes do tratamento(kg)}}{\text{Volume do provete ensaiado}(m^3)} \times \frac{\text{Concentração da solução(\% mássica/mássica)}}{100}$$

29. Pode utilizar-se neste ensaio madeira tratada industrialmente \big(por exemplo por impregnação sob vácuo). Nesse caso, registam-se os protocolos seguidos e analisa-se e regista-se a retenção da madeira tratada deste modo.

Produtos de preservação a aplicar por processos de aplicação superficial

30. Os processos de aplicação superficial compreendem a imersão, a pulverização e a pincelagem dos provetes de madeira utilizados no ensaio. O processo e a taxa de aplicação (por exemplo litros por metro quadrado) devem ser os especificados para a aplicação em superfície do produto de preservação.

31. Também neste caso pode utilizar-se no ensaio madeira tratada industrialmente. Registam-se os protocolos seguidos e analisa-se e regista-se a retenção da madeira tratada deste modo.

Condicionamento após o tratamento dos provetes a utilizar no ensaio

32. Após o tratamento, condicionam-se os provetes tratados destinados ao ensaio de acordo com as recomendações do fornecedor do produto de preservação em estudo constantes da rotulagem deste, de acordo com as práticas de tratamento habituais ou de acordo com a norma EN 252.

▼M6

Preparação e seleção dos provetes a ensaiar

33. Após o condicionamento que se seguiu ao tratamento, calcula-se a retenção média do conjunto dos provetes preparados para o ensaio e selecionam-se aleatoriamente para as medições de lixiviação três séries representativas de provetes cuja retenção não se afaste mais de 5 % do valor médio de retenção do conjunto dos provetes.

PROTOCOLO DE MEDIÇÃO DE EMISSÕES DE PRODUTOS DE PRESERVAÇÃO DA MADEIRA

Método por imersão

34. Pesam-se os provetes ensaiados e mergulham-se totalmente em água, registando-se a data e a hora. Tapa-se o recipiente, para reduzir a evaporação.

35. Substitui-se a água no termo dos seguintes períodos: 6 horas, 1 dia, 2 dias, 4 dias, 8 dias, 15 dias, 22 dias e 29 dias (trata-se de tempos acumulados e não de intervalos entre substituições da água). Registam-se a hora e a data da substituição da água e a massa de água retirada do recipiente.

36. Após cada substituição de água, conserva-se, para ulterior análise química, uma amostra da água na qual a série de provetes ensaiados esteve imersa.

37. Esta colheita de amostras permite calcular o perfil das quantidades emitidas em função do tempo. Conservam-se as amostras em condições que permitam preservar o analito, por exemplo num frigorífico e na obscuridade, a fim de reduzir a proliferação microbiana nas amostras antes das análises.

MEDIÇÕES DAS EMISSÕES

Amostras tratadas

38. Analisam-se quimicamente as amostras de água efetuando a pesquisa da substância ativa e/ou, se for caso disso, dos produtos de degradação/transformação correspondentes.

Amostras não-tratadas

39. A colheita de amostras de água (emissado) neste sistema e a subsequente análise dos produtos químicos lixiviados das amostras de madeira não-tratada permitem estimar eventuais emissões do produto de preservação originárias dessa madeira. A colheita e análise de amostras do emissado após períodos crescentes de exposição permitem estimar a evolução das quantidades emitidas em função do tempo. Estas análises constituem um procedimento de controlo que permite determinar os níveis de fundo do produto químico em estudo na madeira não-tratada, a fim de confirmar que a madeira de proveniência das amostras não foi anteriormente tratada com o produto de preservação em estudo.

DADOS E RELATÓRIOS

Análises químicas

40. Analisam-se quimicamente as amostras de água colhidas e exprimem-se os resultados dessas análises em unidades adequadas, por exemplo µg/l.

Relatório dos dados

41. Registam-se todos os resultados. Sugerem-se em apêndice um modelo de registo para o ensaio de uma série de provetes tratados e um quadro de síntese para cálculo dos valores médios de emissão correspondentes a cada período transcorrido até à colheita das amostras.

42. Calcula-se o fluxo emissivo diário em mg/m^2/dia determinando a média das três medições correspondentes aos três replicados e dividindo pelo número de dias de imersão.

▼M6

Relatório do ensaio

43. Elementos mínimos a constar do relatório do ensaio:

— nome do fornecedor do produto de preservação em estudo;

— nome ou código específico e único do produto de preservação em estudo;

— nome comercial ou comum do(s) ingrediente(s) ativo(s), descrição genérica dos coformulantes (por exemplo cossolvente ou resina) e percentagem mássica dos ingredientes na composição do produto;

— valor pertinente de retenção ou de aplicação (em kg/m^3 ou l/m^2, respetivamente) especificado para madeiras utilizadas em contacto com água;

— espécie de madeira utilizada, com indicação da sua densidade e da velocidade de crescimento em anéis por 10 mm;

— valor da taxa de aplicação ou de retenção do produto de preservação ensaiado, expressa em l/m^2 ou kg/m^3, e fórmula de cálculo dessa taxa;

— método de aplicação do produto de preservação, especificando o programa de tratamento utilizado, no caso de um processo de penetração, ou o método de tratamento à superfície, se tiver sido este o tipo de aplicação;

— data de aplicação do produto de preservação e estimativa do teor de humidade dos provetes ensaiados, expresso em percentagem;

— protocolo de condicionamento seguido, especificando o tipo, as condições e a duração;

— agente selante utilizado nas extremidades e número de aplicações deste;

— indicação de qualquer tratamento subsequente da madeira, por exemplo precisando o fornecedor, o tipo, as características e a taxa de aplicação de uma tinta;

— data e hora de cada imersão, quantidade de água utilizada em cada imersão de provetes ensaiados e quantidade de água absorvida pela madeira durante a imersão;

— qualquer alteração do método descrito e quaisquer fatores suscetíveis de terem influenciado os resultados.

REFERÊNCIAS

1) Norma Europeia EN 84 — 1997. Wood preservatives. Accelerated ageing of treated wood prior to biological testing. Leaching procedure.

2) Norma Europeia EN 113/A1 — 2004. Wood preservatives. Test method for determining the protective effectiveness against wood destroying basidiomycetes. Determination of the toxic values.

3) Norma Europeia EN 252 — 1989. Field test method for testing the relative protective effectiveness of a wood preservative in ground contact.

4) Norma Europeia EN 335 / Parte 1 — 2006. Durability of wood and wood-based products — Definition of use classes — Part 1: General.

5) American Society for Testing and Materials Standards, ASTM D 1141 — 1998. Standard Practice for the Preparation of Substitute Ocean Water, Without Heavy Metals. *Annual Book of ASTM Standards*, volume 11.02.

6) American Society for Testing and Materials Standards, ASTM D 1193-77, Type II — 1983. Specifications for Reagent Water. *Annual Book of ASTM Standards*, volume 11.01.

▼M6

Apêndice 1

Modelo de registos para este método

Estimativa das emissões para o ambiente de madeiras tratadas com produtos de preservação da madeira: método laboratorial para artigos de madeira sem cobertura e em contacto com água doce ou com água do mar

Local do ensaio	

Produto de preservação da madeira

Fornecedor do produto	
Nome ou código específico e único do produto	
Nome comercial ou comum do produto	
Coformulantes	
Retenção para madeira utilizada em contacto com água	

Aplicação

Método de aplicação	
Data da aplicação	
Fórmula utilizada para calcular a retenção	
Protocolo de condicionamento	
Duração do condicionamento	
Selante das extremidades e número de aplicações	
Tratamento subsequente	se for caso disso

Provetes ensaiados

Espécie de madeira	
Densidade da madeira	(mínimo … valor médio … máximo)
Velocidade de crescimento (anéis por 10 mm)	(mínimo … valor médio … máximo)
Teor de humidade	

▼M6

Conjuntos ensaiados (*)	**Retenção (por exemplo em kg/m^3)**
Com tratamento «x»	Valor médio e desvio-padrão, ou intervalo, correspondentes aos 5 provetes
Com tratamento «y»	Valor médio e desvio-padrão, ou intervalo, correspondentes aos 5 provetes
Com tratamento «z»	Valor médio e desvio-padrão, ou intervalo, correspondentes aos 5 provetes
Sem tratamento	
Alterações de parâmetros do método de ensaio	Por exemplo, qualidade da água, dimensão dos provetes ensaiados etc.

(*) x, y, z representam os três replicados de amostras.

▼M6

Cronologia	Substituição da água	Massa do provete		Absorção de água		Amostras de água				
		Com tratamento (média)	Sem tratamento	Com tratamento (média)	Sem tratamento		Água utilizada no ensaio	x	y	z
	Data	g	g	g	g	n.º	pH	pH	pH	pH
início										
6 h						1				
24 h						2				
2 dias						3				
4 dias						4				
8 dias						5				
15 dias						6				
22 dias						7				
29 dias						8				

▼M6

Um quadro para cada ingrediente ativo

Cronologia	Substituição da água	Resultados analíticos															
		Provetes sem tratamento			Provetes com tratamento												
		Concentração do ingrediente ativo na água mg/l	Quantidade emitida mg/m^2	Taxa de emissão mg/m^2/dia	Concentração do ingrediente ativo na água				Quantidade emitida				Taxa de emissão			
					x	y	z	Média	x	y	z	Média	x	y	z	Média
	Data				mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/m^2	mg/m^2	mg/m^2	mg/m^2	mg/m^2 /dia	mg/m^2/dia	mg/m^2/dia	mg/m^2/dia
6 h																
24 h																
2 dias																
4 dias																
8 dias																
15 dias																
22 dias																
29 dias																

Nota: Dado que os valores correspondentes aos provetes sem tratamento podem ter de ser utilizados para corrigir as emissões das amostras tratadas, os resultados correspondentes aos provetes sem tratamento devem ser indicados em primeiro lugar, sendo «valores corrigidos» todos os valores correspondentes às amostras com tratamento. Pode haver também uma correção decorrente da análise inicial da água.

▼**M6**

Apêndice 2

Definições

Produto químico: Substância ou mistura.

Produto químico em estudo: Qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado este método de ensaio.

▼M6

C.46. BIOACUMULAÇÃO EM OLIGOQUETAS BENTÓNICOS SEDIMENTARES

INTRODUÇÃO

1. Este método de ensaio é equivalente ao *Test Guideline* TG 315 (2008) da OCDE. Os animais endobentónicos que ingerem sedimentos podem ser expostos a substâncias ligadas aos sedimentos (1). Entre esses animais que ingerem sedimentos, os oligoquetas aquáticos desempenham um papel importante na base dos sistemas aquáticos. Vivem nos sedimentos e representam, frequentemente, as espécies mais abundantes, sobretudo nos habitats com condições ambientais adversas para outros animais. Através da bioturbação dos sedimentos e ao servirem de presa, estes animais podem influenciar fortemente a biodisponibilidade das referidas substâncias para outros organismos, por exemplo os peixes bentívoros. Ao contrário dos organismos epibentónicos, os oligoquetas aquáticos endobentónicos enterram-se nos sedimentos e ingerem partículas dos sedimentos abaixo da superfície destes. Estes organismos estão, portanto, expostos às ditas substâncias através de várias vias de absorção, como o contacto direto, a ingestão de partículas de sedimentos contaminadas, a água dos poros e a água sobrenadante. No apêndice 6 referem-se algumas espécies de oligoquetas bentónicos atualmente utilizadas em ensaios ecotoxicológicos.

2. Entre os parâmetros que caracterizam a bioacumulação de uma substância contam-se, em primeiro lugar, o fator de bioacumulação (FBA), a constante de velocidade de absorção dos sedimentos (k_s) e a constante de velocidade de eliminação (k_e). O apêndice 1 define em pormenor estes parâmetros.

3. É necessário um método de ensaio específico do compartimento ambiental em causa para avaliar em termos gerais o potencial de bioacumulação das substâncias e para investigar a bioacumulação das substâncias que tenham tendência a distribuir-se pelos sedimentos (1)(2)(3)(4).

4. Este método de ensaio destina-se a avaliar a bioacumulação de substâncias associadas aos sedimentos em vermes oligoquetas endobentónicos. Enriquecem-se os sedimentos na substância em estudo. A utilização de sedimentos enriquecidos pretende simular sedimentos contaminados.

5. O método baseia-se em métodos existentes de ensaio da toxicidade e da bioacumulação em sedimentos (1)(4)(5)(6)(7)(8)(9). Outros documentos úteis são os debates e as conclusões de um grupo de trabalho internacional (11) e os resultados de um estudo interlaboratorial comparativo internacional (12).

6. O ensaio é aplicável a substâncias orgânicas neutras estáveis com tendência a associarem-se aos sedimentos. O método pode igualmente servir para medir a bioacumulação de compostos organometálicos estáveis associados aos sedimentos (12). Não é aplicável a metais nem a outros elementos vestigiais (11) sem adaptações do protocolo de ensaio no tocante a volumes de substrato e de água e, possivelmente, à quantidade das amostras de tecidos.

PRÉ-REQUISITOS E INFORMAÇÕES SOBRE A SUBSTÂNCIA EM ESTUDO

7. São ainda em pequeno número as relações quantitativas estrutura-atividade (QSAR) bem assentes relativamente a processos de bioacumulação (14). A relação mais amplamente utilizada é a correlação entre a bioacumulação e bioconcentração de substâncias orgânicas estáveis, por um lado, e a lipofilia das mesmas (expressa pelo logaritmo do coeficiente de partição octanol-água, log K_{ow}; ver a definição deste no apêndice 1), por outro, que foi desenvolvida para descrever a repartição de substâncias entre a água e os

▼M6

peixes. Esta relação também permitiu estabelecer correlações para o compartimento dos sedimentos (15)(16)(17)(18). A correlação log K_{ow}-log FBC, importante relação quantitativa estrutura-atividade, pode ser útil para uma primeira estimativa, preliminar, do potencial de bioacumulação de substâncias associadas aos sedimentos. Porém, o fator de bioacumulação pode ser influenciado pelo teor de lípidos do organismo sujeito ao ensaio e pelo teor de carbono orgânico dos sedimentos. Também pode, portanto, utilizar-se o coeficiente de partição carbono orgânico-água (K_{co}) como fator indicativo determinante da bioacumulação de substâncias orgânicas associadas aos sedimentos.

8. Este ensaio aplica-se a:

— substâncias orgânicas estáveis com valores de log K_{ow} compreendidos entre 3,0 e 6,0 (5)(19) e substâncias superlipófilas com log K_{ow} superior a 6,0 (5);

— substâncias pertencentes a classes de substâncias orgânicas conhecidas pelo seu potencial de bioacumulação em organismos vivos, por exemplo substâncias tensioativas ou fortemente adsorventes (por exemplo com K_{co} elevado).

9. Antes de iniciar o estudo, é necessário dispor de determinadas informações sobre a substância em estudo, nomeadamente ao nível de precauções de segurança, de condições adequadas de conservação e de estabilidade, bem como dos métodos analíticos necessários. As referências (20) e (21) contêm orientações sobre o ensaio de substâncias cujas propriedades físico-químicas dificultam o ensaio das mesmas. Antes de proceder a um ensaio de bioacumulação com oligoquetas aquáticos, é necessário dispor das seguintes informações sobre a substância em estudo:

— denominação comum, denominação química (de preferência a denominação IUPAC), fórmula estrutural, número de registo CAS, grau de pureza;

— hidrossolubilidade [método de ensaio A.6 (22)];

— coeficiente de partição octanol-água, K_{ow} [métodos de ensaio A.8 e A.24 (22)];

— coeficiente de partição sedimentos-água, expresso por K_d ou K_{co} [método de ensaio C.19 (22)];

— hidrólise [método de ensaio C.7 (22)];

— fototransformação na água (23);

— pressão de vapor [método de ensaio A.4 (22)];

— biodegradabilidade fácil [métodos de ensaio C.4 e C.29 (22)];

— tensão superficial [método de ensaio A.5 (22)];

— concentração micelar crítica (24).

Quando disponíveis, têm também importância as seguintes informações:

— biodegradação no meio aquático [métodos de ensaio C.24 e C.25 (22)];

— constante de Henry.

10. A marcação radioativa das substâncias em estudo pode facilitar a análise das amostras de água e de sedimentos e das amostras biológicas, podendo recorrer-se a esta via para determinar se é ou não necessário identificar e quantificar produtos de degradação. O método aqui descrito foi validado num estudo interlaboratorial comparativo internacional (12) aplicável a substâncias marcadas com ^{14}C. Caso se determinem os resíduos radioativos totais, o fator de bioacumulação baseia-se na substância parental e nos produtos de degradação considerados. É igualmente possível combinar um estudo metabólico com um estudo de bioacumulação, procedendo para o efeito à análise,

▼M6

e à determinação quantitativa da percentagem, da substância parental e dos produtos de degradação desta em amostras colhidas no final da fase de absorção ou coincidentes com o nível máximo de bioacumulação. Em qualquer dos casos, recomenda-se que o cálculo do fator de bioacumulação se baseie na concentração da substância parental nos organismos e não apenas nos resíduos radioativos totais.

11. Além das propriedades da substância em estudo, outra informação necessária é a toxicidade para a espécie de oligoquetas a utilizar no ensaio, como uma concentração letal mediana (CL_{50}) correspondente ao período da fase de absorção, para que as concentrações de exposição escolhidas sejam muito inferiores aos níveis tóxicos. Se possível, deve ser dada preferência a valores de toxicidade derivados de estudos de longa duração de parâmetros subletais (CE_{50}). Caso não se disponha desses dados, um ensaio de toxicidade aguda em condições idênticas às do ensaio de bioacumulação ou dados toxicológicos relativos a espécies alternativas podem fornecer informações úteis.

12. Deve dispor-se de um método de análise adequado, cujas exatidão, precisão e sensibilidade sejam conhecidas, para determinar quantitativamente a substância nas soluções de ensaio, nos sedimentos e nas matérias biológicas e devem conhecer-se os pormenores da preparação e da conservação das amostras. Deve dispor-se também das correspondentes fichas de dados de segurança. É necessário conhecer igualmente os limites de deteção analítica da substância em estudo na água, nos sedimentos e nos tecidos dos vermes. Se for utilizado no ensaio uma substância com marcação radioativa, devem ser também conhecidas a radioatividade específica (em $Bq.mol^{-1}$), a localização do átomo marcador e a percentagem de radioatividade associada a impurezas. Para que possam detetar-se no ensaio concentrações o mais baixas possível, a radioatividade específica da substância em estudo deve ser o mais elevada possível (11).

13. Deve dispor-se ainda de informações sobre as características dos sedimentos que serão utilizados [por exemplo a origem dos sedimentos ou dos componentes destes, o pH e a concentração de amoníaco da água dos poros (sedimentos naturais), o teor de carbono orgânico total, a distribuição granulométrica das partículas (percentagem de areias, de limos e de argilas) e a percentagem de resíduo seco] (6).

PRINCÍPIO DO MÉTODO

14. O ensaio compreende duas fases: a fase de absorção (exposição) e a fase de eliminação (após a exposição). Durante a primeira, expõem-se os vermes a sedimentos enriquecidos na substância em estudo, imersos em água reconstituída e convenientemente equilibrados (11). Ensaiam-se grupos de vermes de controlo em condições idênticas, mas sem a substância em estudo.

15. Para a fase de eliminação, transferem-se os vermes para um sistema sedimentos-água isento da substância em estudo. A fase de eliminação é necessária para obter informações sobre a velocidade à qual a substância é excretada pelos organismos sujeitos ao ensaio (19)(25). A menos que a absorção da substância em estudo durante a fase de exposição seja insignificante (isto é, caso não se verifique nenhuma diferença com significância estatística entre a concentração da substância em estudo nos vermos sujeitos ao ensaio e nos vermes de controlo), é sempre necessária uma fase de eliminação. Se, durante a fase de absorção, não tiver sido atingido um estado estacionário, a determinação dos parâmetros cinéticos — fator de bioacumulação cinético (FBA_k), constante de velocidade de absorção e constante de velocidade de eliminação — pode basear-se nos resultados da fase de eliminação. Monitorizam-se as variações de concentração da substância em estudo nos vermes ao longo de ambas as fases do ensaio.

16. Durante a fase de absorção, efetuam-se medições até o fator de bioacumulação atingir um patamar ou um estado estacionário. Salvo indicação em contrário, a duração da fase de absorção é de 28 dias. A prática revelou que, no caso de várias substâncias orgânicas neutras estáveis, uma fase de absorção de 12 a 14 dias é suficiente para atingir o estado estacionário (6)(8)(9).

▼M6

17. Porém, mesmo que não se atinja o estado estacionário em 28 dias, dá-se início à fase de eliminação transferindo os oligoquetas expostos para recipientes nos quais foi introduzido o mesmo meio, mas sem a substância em estudo. Dá-se a fase de eliminação por terminada quando se atingir um nível de concentração correspondente a 10 % da concentração medida nos vermes no dia 28 da fase de absorção, ou após transcorrido um período máximo de 10 dias. O nível de resíduos nos vermes no final da fase de eliminação constitui um parâmetro adicional a inscrever no relatório, por exemplo como «resíduos não-eliminados». Preferencialmente, calcula-se o fator de bioacumulação como a razão entre a concentração nos vermes (C_a) e nos sedimentos (C_s) em estado estacionário aparente (FBA_{EE}) e, admitindo uma cinética de primeira ordem, também como a razão FBA_k (fator de bioacumulação cinético) entre a constante de velocidade de absorção a partir dos sedimentos (k_s) e a constante de velocidade de eliminação (k_e). Caso não se atinja um estado estacionário em 28 dias, calcula-se FBA_k a partir da constante de velocidade de absorção e da constante de velocidade de eliminação. Ver o detalhe dos cálculos no apêndice 2. Caso a cinética não seja de primeira ordem, será necessário recorrer a modelos mais complexos (ver o apêndice 2 e a referência 25).

18. Caso não se atinja um estado estacionário em 28 dias, pode eventualmente prolongar-se a fase de absorção, efetuando medições suplementares a grupos de vermes expostos (se ainda os houver) até se atingir o estado estacionário. Paralelamente, dá-se, no entanto, início à fase de eliminação no dia 28 da fase de absorção.

19. A constante de velocidade de absorção, a constante (ou constantes, se forem utilizados modelos mais complexos) de velocidade de eliminação, o fator de bioacumulação cinético FBA_k) e, se possível, os limites de confiança de cada um destes parâmetros são calculados a partir das equações dos correspondentes modelos informáticos (ver os modelos no apêndice 2). A adequação de um modelo pode ser determinada a partir do coeficiente de correlação ou do coeficiente de determinação (coeficientes próximos de 1 indicam boa adequação).

20. Para reduzir a variabilidade dos resultados do ensaio no caso das substâncias orgânicas muito lipofílicas, exprimem-se ainda os fatores de bioacumulação em relação ao teor de lípidos dos organismos sujeitos ao ensaio e ao teor de carbono orgânico total dos sedimentos (fator de acumulação biota-sedimentos, FABS, em kg de carbono orgânico total nos sedimentos por kg de lípidos nos vermes). Esta abordagem baseia-se em correlações teóricas e resultados experimentais para o compartimento aquático, no qual — para algumas classes químicas — existe uma relação clara entre o potencial de bioacumulação da substância e a sua lipofilia, bem estabelecida utilizando peixes como organismos-modelo (14)(25)(27). Existe igualmente uma relação entre o teor de lípidos dos peixes sujeitos aos ensaios e a bioacumulação das substâncias em causa. Detetaram-se correlações similares para organismos bentónicos (15)(16)(17)(18). Caso se disponha de tecido suficiente, pode determinar-se o teor de lípidos dos vermes sujeitos ao ensaio na mesma matéria biológica utilizada para determinar a concentração da substância em estudo. Porém, para medir o teor de lípidos, é mais prático utilizar animais de controlo aclimatados, pelo menos no início ou, de preferência, no final da fase de absorção, teores esses que depois podem ser utilizados para normalizar os valores de FBA.

VALIDADE DO ENSAIO

21. Para que um ensaio possa considerar-se válido, têm de ser cumpridas as seguintes condições:

— Mortalidade acumulada de vermes (vermes de controlo e vermes expostos) até ao final do ensaio não superior a 20 % dos efetivos iniciais de vermes;

— Enterramento comprovado dos vermes nos sedimentos, para garantir a exposição máxima. Para mais informações, ver o ponto 28.

▼M6

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Espécies ensaiadas

22. O ensaio pode realizar-se com várias espécies de oligoquetas aquáticos. Indicam-se no apêndice 6 as espécies mais frequentemente utilizadas.

23. Devem ser realizados ensaios de toxicidade (96 h apenas em água) a intervalos regulares (por exemplo todos os meses) com uma substância tóxica de referência, como o cloreto de potássio (KCl) ou o sulfato de cobre ($CuSO_4$) (1), para comprovar o estado sanitário dos animais sujeitos ao ensaio (1)(6). Caso não se realizem ensaios de toxicidade com substâncias tóxicas de referência a intervalos regulares, será necessário verificar o lote de organismos destinados ao ensaio de bioacumulação em sedimentos recorrendo a uma substância tóxica de referência. A determinação do teor de lípidos também pode fornecer informações úteis sobre o estado dos animais.

Cultura dos organismos a ensaiar

24. A fim de se dispor de um número suficiente de vermes para a realização dos ensaios de bioacumulação, pode ser necessário manter no laboratório uma cultura permanente da espécie em causa. Resumem-se no apêndice 6 alguns métodos de cultura em laboratório das espécies escolhidas para os ensaios. Ver mais pormenores nas referências (8)(9)(10)(18)(28)(29)(30)(31)(32).

Material e aparelhagem

25. Não deve utilizar-se, em nenhuma parte do equipamento, nenhuma matéria suscetível de dissolver ou de absorver a substância em estudo ou de libertar outras substâncias ou que tenha efeitos adversos nos animais sujeitos ao ensaio. Podem ser utilizadas câmaras normalizadas retangulares ou cilíndricas, de matérias quimicamente inertes e com capacidade adequada à carga, isto é, com capacidade adequada ao número de vermes sujeitos ao ensaio. É de evitar a utilização de tubos de plástico flexíveis para administrar água ou ar. As partes que entram em contacto com os meios de ensaio devem ser de politetrafluoroetileno, aço inoxidável e/ou vidro. No caso de substâncias com coeficiente de adsorção elevado, como os piretroides sintéticos, pode ser necessário utilizar vidro silanizado. Nessas situações, descarta-se o equipamento utilizado (5). No caso do estudo de substâncias com marcação radioativa e de substâncias voláteis, é necessário evitar a evaporação e a consequente perda dessas substâncias. Devem ser utilizadas armadilhas (por exemplo garrafas de vidro para lavagem de gases) que contenham absorventes capazes de reter os resíduos que se evaporem das câmaras de ensaio (11).

Água

26. A qualidade da água sobrenadante deve permitir a sobrevivência da espécie sujeita ao ensaio durante os períodos de aclimatação e de ensaio, sem que os animais adquiram uma aparência anormal nem tenham comportamentos anormais. Como água sobrenadante, recomenda-se a utilização nos ensaios, bem como nas culturas laboratoriais de vermes, de água reconstituída de acordo com o método C.1 (25). Demonstrou-se que várias espécies utilizadas nos ensaios podem sobreviver, crescer e reproduzir-se nesta água (8), que maximiza igualmente a normalização das condições de cultura dos vermes e de realização dos ensaios. É necessário caracterizar a água pelo menos em termos de pH, condutividade e dureza. A pesquisa de micropoluentes na água antes da utilização pode fornecer informações úteis (apêndice 4).

27. A qualidade da água deve manter-se constante durante o ensaio. O pH da água sobrenadante deve manter-se entre 6 e 9. No início do ensaio, a dureza total deve estar compreendida entre 90 mg e 400 mg de $CaCO_3$ por litro (7). O método C.1 (25) indica intervalos de pH e de dureza na referida água

▼M6

reconstituída. Caso se suspeite de alguma interação entre os iões responsáveis pela dureza da água e a substância em estudo, deve utilizar-se uma água menos dura. O apêndice 4 resume critérios adicionais de aceitação de uma água de diluição, de acordo com o *Test Guideline* TG 210 da OCDE (34).

Sedimentos

28. A qualidade dos sedimentos deve permitir a sobrevivência e, de preferência, a reprodução dos organismos sujeitos ao ensaio durante os períodos de aclimatação e de ensaio, sem que os animais adquiram uma aparência anormal nem tenham comportamentos anormais. É necessário que os vermes se enterrem nos sedimentos. O comportamento de enterramento pode influenciar a exposição e, consequentemente, o fator de bioacumulação. Por conseguinte, se a turbidez da água sobrenadante o permitir, deve registar-se o comportamento dos organismos sujeitos ao ensaio em termos de tendência de afastamento dos sedimentos ou de enterramento. Os vermes de controlo e os vermes expostos devem enterrar-se nos sedimentos no prazo máximo de 24 h após a transferência para os recipientes de ensaio. Caso se observe que há vermes que definitivamente não se enterram nos sedimentos ou deles se afastam (por exemplo mais de 20 % nessas condições em mais de metade da fase de absorção), esta constatação indicia que as condições de realização do ensaio não são adequadas, que os vermes não estão saudáveis ou que a concentração da substância em estudo induz o comportamento observado. Nesse caso, interrompe-se o ensaio e repete-se este em melhores condições. É possível obter informações adicionais sobre a ingestão de sedimentos recorrendo aos métodos descritos nas referências (35) e (36), que se reportam à ingestão de sedimentos e à seleção de partículas pelos organismos sujeitos ao ensaio. Caso seja observável, deve registar-se e ter-se em conta na interpretação dos resultados do ensaio, no tocante às vias de exposição, pelo menos a presença ou ausência de excrementos à superfície dos sedimentos, a qual, a ocorrer, é reveladora de que os vermes ingeriram sedimentos.

29. Uma vez que podem não estar disponíveis durante todo o ano sedimentos naturais de qualidade adequada, recomenda-se a utilização, nos ensaios e nas culturas laboratoriais de vermes, de sedimentos artificiais baseados no solo artificial descrito no método de ensaio C.8 (40). Além disso, o ensaio pode ser influenciado pelos organismos indígenas dos sedimentos naturais e pelos micropoluentes eventualmente presentes nestes. Várias espécies sobrevivem, crescem e reproduzem-se nos sedimentos artificiais, podendo ser utilizadas nos ensaios (8).

30. É necessário caracterizar os sedimentos artificiais pelo menos em termos de origem dos componentes, distribuição granulométrica (percentagem de areias, de limos e de argilas), de teor de carbono orgânico total, de humidade e de pH. A medição do potencial redox é facultativa. Contudo, também sedimentos naturais de locais não-poluídos podem servir para o ensaio e/ou para a cultura (1). É necessário caracterizar os sedimentos naturais pelo menos em termos de origem (local de recolha), pH e teor de amoníaco da água dos poros, teor de carbono orgânico total, distribuição granulométrica (percentagem de areias, de limos e de argilas) e percentagem de humidade (6). Caso seja de prever a formação de amoníaco nos sedimentos naturais, recomenda-se que, antes do enriquecimento destes com a substância em estudo, os sedimentos sejam mantidos durante sete dias em condições idênticas às do ensaio a realizar a seguir. Remove-se e descarta-se a água sobrenadante depois deste período de condicionamento. A pesquisa de micropoluentes nos sedimentos ou nos componentes destes antes da utilização pode fornecer informações úteis.

Preparação

31. As referências (1), (6) e (44) descrevem a manipulação de sedimentos naturais antes da utilização dos mesmos em laboratório. Descreve-se no apêndice 5 a preparação de sedimentos artificiais.

▼M6

Conservação

32. A conservação de sedimentos naturais em laboratório deve ser o mais curta possível. A Agência de Proteção do Ambiente dos E.U.A (6) recomenda um período de conservação máximo de 8 semanas, na obscuridade, a 4 °C ± 2 °C. Não deve existir nenhum espaço livre acima da superfície dos sedimentos nos recipientes de conservação. No apêndice 5 estabelecem-se algumas recomendações para a conservação de sedimentos artificiais.

Aplicação da substância em estudo

33. Enriquecem-se os sedimentos com a substância em estudo. O enriquecimento consiste no revestimento de um ou mais componentes dos sedimentos com a substância em estudo. Por exemplo, pode embeber-se a areia quartzítica (ou uma parte dela, por exemplo 10 g de areia em cada recipiente de ensaio) com uma solução da substância em estudo num solvente adequado, que, em seguida, é lentamente evaporado até à secura. A fração revestida pode, então, ser misturada com os sedimentos humedecidos. Ao preparar os sedimentos, é necessário ter em conta a quantidade de areia da mistura de areia e de substância em estudo (ou seja, utiliza-se menos areia na preparação dos sedimentos) (6).

34. No caso de sedimentos naturais, pode adicionar-se a substância em estudo enriquecendo, pelo método descrito para sedimentos artificiais, uma porção seca dos sedimentos, ou misturando a substância em estudo com sedimentos húmidos, evaporando em seguida o agente solubilizante eventualmente utilizado. São solventes adequados para o enriquecimento de sedimentos húmidos o etanol, o metanol, os éteres mono e dimetílico do etilenoglicol, a dimetilformamida e o trietilenoglicol (5)(34). A toxicidade e a volatilidade do solvente e a solubilidade da substância em estudo no solvente escolhido são os critérios principais para a seleção de um agente solubilizante adequado. A referência (41) [Environment Canada (1995)] contém mais orientações sobre o processo de enriquecimento. Deve ter-se o cuidado de assegurar uma distribuição completa e uniforme da substância em estudo nos sedimentos aos quais é adicionada. Analisam-se subamostras replicadas dos sedimentos enriquecidos para verificar as concentrações da substância em estudo nos sedimentos e determinar o grau de homogeneidade da distribuição da substância nestes.

35. Uma vez preparados os sedimentos enriquecidos com a fase aquosa sobrenadante, é conveniente permitir a repartição da substância em estudo entre a fase aquosa e os sedimentos. A repartição deve ocorrer, de preferência, às condições de temperatura e arejamento utilizadas no ensaio. O tempo necessário para atingir o equilíbrio depende dos sedimentos e da substância, podendo variar de algumas horas a vários dias e mesmo, em casos raros, chegar a ser de 4 ou 5 semanas (28)(42). Neste ensaio, não se espera até se atingir o equilíbrio, mas recomenda-se um período de equilibração de 48 horas a 7 dias. Consoante a finalidade do estudo — por exemplo caso se pretenda simular condições ambientais –, pode dilatar-se o período de equilibração ou de envelhecimento dos sedimentos enriquecidos (11).

REALIZAÇÃO DO ENSAIO

Ensaio preliminar

36. Poderá ser útil efetuar um ensaio preliminar com o objetivo de otimizar as condições do ensaio definitivo no que respeita, nomeadamente, à seleção da concentração ou concentrações da substância em estudo e à duração das fases de absorção e de eliminação. Durante esse ensaio preliminar, observa-se e regista-se o comportamento dos vermes, verificando se, por exemplo, os vermes se afastam dos sedimentos, reação que pode dever-se à substância

▼M6

em estudo e/ou aos próprios sedimentos. O afastamento dos vermes dos sedimentos também pode ser utilizado como parâmetro subletal num ensaio preliminar de estimativa da concentração ou concentrações da substância em estudo a utilizar no ensaio de bioacumulação.

Condições de exposição

Duração da fase de absorção

37. Os organismos sujeitos a ensaio são expostos à substância em estudo durante a fase de absorção. Colhe-se a primeira amostra entre 4 h e 24 horas após o início desta fase. A fase de absorção deve prolongar-se por não mais de 28 dias (1)(6)(11), a menos que se demonstre que já foi atingido o equilíbrio. Atinge-se o estado estacionário quando: i) a representação gráfica do fator de bioacumulação correspondente a cada período a que se reporta uma colheita de amostras, em função do tempo, é paralela ao eixo dos tempos; ii) três análises sucessivas do FBA, em amostras colhidas a intervalos de, pelo menos, dois dias entre elas, não diferem mais de 20 % entre si; e iii) não há diferenças com significância estatística entre os três períodos a que se reportam as colheitas de amostras (com base em comparações estatísticas, por exemplo análise de variância e análise de regressão). Caso não se atinja o estado estacionário em 28 dias, pode pôr-se termo à fase de absorção dando início à fase de eliminação e pode calcular-se o fator de bioacumulação FBA_k a partir da constante de velocidade de absorção e da constante de velocidade de eliminação (ver igualmente os pontos 16 a 18).

Duração da fase de eliminação

38. Colhe-se a primeira amostra 4 h a 24 horas após o início da fase de eliminação, pois os resíduos presentes nos tecidos podem variar rapidamente no período inicial. Recomenda-se que se ponha termo à fase de eliminação quando a concentração da substância em estudo for inferior a 10 % da concentração em estado estacionário ou após um período máximo de 10 dias. O nível de resíduos nos vermes no final da fase de eliminação constitui um parâmetro secundário a inscrever no relatório. O referido período pode, porém, ser condicionado pelo período em que a concentração da substância em estudo nos vermes é superior ao limite de deteção analítica.

Organismos utilizados no ensaio

Número de vermes utilizado no ensaio

39. A massa de tecido correspondente ao número de vermes de cada amostra deve ser tal que a massa de substância em estudo por amostra no início da fase de absorção e no final da fase de eliminação seja significativamente maior do que o limite de deteção da substância em estudo na matéria biológica. Nesses estádios das fases de absorção e de eliminação, em geral a concentração nos animais sujeitos ao ensaio é relativamente baixa (6)(8)(18). Dado que, em muitas espécies de oligoquetas aquáticos, o peso de um indivíduo é muito baixo (5-10 mg de peso húmido por indivíduo no caso da *Lumbriculus variegatus* e da *Tubifex tubifex*), podem reunir-se os vermes de uma dada câmara de ensaio replicada para as pesagens e a análise da substância em estudo. No caso das espécies cujos indivíduos sejam mais pesados (por exemplo a *Branchiura sowerbyi*), podem utilizar-se replicados com apenas um indivíduo, mas, nessa eventualidade, deve aumentar-se o número de replicados para cinco por ponto de colheita de amostras (11). Importa, porém, referir que a *Branchiura sowerbyi* não foi incluída no estudo interlaboratorial comparativo (12), pelo que não se recomenda a utilização preferencial desta espécie no método.

40. Os vermes utilizados devem ter dimensões semelhantes (ver no apêndice 6 o caso da *Lumbriculus variegatus*). Devem provir da mesma origem e ser animais adultos ou crescidos da mesma classe etária (ver o apêndice 6). O peso e a idade do animal podem influenciar os valores dos fatores de bioacumulação (por exemplo devido a teores de lípidos diferentes e/ou à presença de ovos), pelo que estes parâmetros devem ser registados com exatidão. Para determinar o peso médio húmido e seco, pesa-se uma subamostra de vermes antes de iniciar o ensaio.

▼M6

41. No caso da *Tubifex tubifex* e da *Lumbriculus variegatus*, é de prever reprodução durante o período de ensaio. Caso não haja reprodução durante o ensaio de bioacumulação, regista-se esse facto, que deve ser tido em conta na interpretação dos resultados do ensaio.

Taxa de carga

42. A fim de minimizar a redução da concentração da substância em estudo nos sedimentos durante a fase de absorção e para evitar que a concentração de oxigénio dissolvido diminua, as razões sedimentos/verme e água/verme devem ser elevadas. A taxa de carga escolhida também deve corresponder às densidades populacionais da espécie em causa observadas na natureza (43). Por exemplo, no caso da *Tubifex tubifex*, recomenda-se uma taxa de carga de 1-4 mg de tecido de vermes (peso húmido) por grama de sedimentos húmidos (8)(11). No caso da *Lumbriculus variegatus*, as referências (1) e (6) recomendam uma taxa de carga ≤1 g de peso seco de tecido de vermes por 50 g de carbono orgânico dos sedimentos.

43. Retiram-se da cultura os vermes a utilizar no ensaio por peneiração dos sedimentos de cultura. Transferem-se os animais (adultos ou animais crescidos sem sinais de fragmentação recente) para placas de vidro (por exemplo placas de Petri) já com água limpa. Se as condições de realização do ensaio diferirem das condições de cultura, deverá ser suficiente uma fase de aclimatação de 24 horas. Antes de pesar os vermes, é necessário retirar deles o excesso de água. Para isso, os vermes podem ser colocados com cuidado sobre papel absorvente previamente humedecido. Não se recomenda a secagem dos vermes com papel absorvente, pois isso poderia pô-los numa situação de tensão ou lesioná-los. Brunson *et al.* (1998) recomendam a utilização de vermes não-enxutos cuja massa represente aproximadamente 1,33 vezes a biomassa pretendida. Estes 33 % adicionais correspondem à diferença entre os vermes enxutos e não-enxutos (28).

44. No início da fase de absorção (dia 0 do ensaio), retiram-se os organismos a ensaiar da câmara de aclimatação e distribuem-se aleatoriamente por recipientes (por exemplo placas de Petri) que contenham água reconstituída, transferindo dois vermes para cada recipiente de cada vez até cada um deles ter dez vermes. Em seguida, transfere-se aleatoriamente cada um desses grupos de vermes para um de vários recipientes de ensaio, utilizando, por exemplo, uma pinça de aço flexível. Segue-se a incubação dos recipientes de ensaio nas condições previstas.

Alimentação

45. Dado o baixo teor de nutrientes dos sedimentos artificiais, tem de ser incorporada nestes uma fonte alimentar. Para não subestimar a exposição dos organismos sujeitos ao ensaio, por exemplo fornecendo seletivamente uma alimentação não-contaminada, os alimentos necessários à reprodução e ao crescimento desses organismos devem ser adicionados aos sedimentos, de uma só vez, antes ou durante a aplicação da substância em estudo (ver o apêndice 5).

Proporção entre sedimentos e água

46. Recomenda-se uma proporção 1:4 entre os sedimentos e a água (45). Considera-se esta proporção adequada para manter níveis apropriados de concentração de oxigénio e evitar a acumulação de amoníaco na água sobrenadante. Deve manter-se a concentração de oxigénio na água sobrenadante a 40 % ou mais da concentração de saturação. Areja-se suavemente a água sobrenadante dos recipientes de ensaio (por exemplo 2 a 4 bolhas por segundo) com uma pipeta de Pasteur cuja ponta é colocada cerca de 2 cm acima da superfície dos sedimentos, para minimizar a perturbação destes.

▼M6

Luz e temperatura

47. O fotoperíodo da cultura e do ensaio é de 16 horas (1)(6). Deve manter-se a intensidade luminosa na zona onde decorre o ensaio a cerca de 500-1 000 lux. A temperatura deve ser de 20 °C ± 2 °C ao longo de todo o ensaio.

Concentrações ensaiadas

48. Para determinar a cinética da absorção, utiliza-se uma das concentrações ensaiadas (a mais baixa possível), mas pode utilizar-se também para o efeito uma segunda concentração (mais elevada) — ver, por exemplo, (46). Nessa eventualidade, analisam-se amostras colhidas em estado estacionário ou após 28 dias, para confirmar o fator de bioacumulação medido à concentração mais baixa (11). A escolha dessa concentração mais elevada deve excluir a ocorrência de efeitos indesejados (escolhendo, por exemplo, 1 % da concentração com efeitos crónicos, CE_x, mais baixa conhecida, obtida a partir de estudos pertinentes de toxicidade crónica). A concentração ensaiada mais baixa deve estar significativamente acima do limite de deteção nos sedimentos e nas amostras biológicas do método analítico utilizado. Se a concentração com efeitos da substância em estudo for próxima do limite de deteção analítica, recomenda-se o estudo de uma substância marcada radioativamente, com elevada radioatividade específica.

Replicados expostos e de controlo

49. O número mínimo de replicados expostos a utilizar para medições cinéticas é de três por ponto de colheita de amostras (11) das fases de absorção e de eliminação. Para datas adicionais de colheita de amostras com caráter facultativo, por exemplo, devem ser utilizados replicados suplementares. Para a fase de eliminação, prepara-se o número conveniente de replicados com sedimentos não-enriquecidos e água sobrenadante, de modo que, no final da fase de absorção, os vermes expostos possam ser transferidos dos recipientes de exposição a isso destinados para recipientes não-expostos. O número de replicados expostos deve ser suficiente para a fase de absorção e a fase de eliminação.

50. Em alternativa, os vermes destinados à colheita de amostras durante a fase de eliminação podem ser expostos num recipiente grande que contenha sedimentos enriquecidos do mesmo lote utilizado para o estudo cinético da fase de absorção. É necessário demonstrar que as condições de realização do ensaio (designadamente a espessura de sedimentos, a proporção sedimentos/ /água, a taxa de carga, a temperatura e a qualidade da água) são comparáveis às dos replicados destinados à fase de absorção. No final da fase de absorção, colhem-se naquele recipiente, para análise, amostras de água, de sedimentos e de vermes, retirando-se cuidadosamente e transferindo um número suficiente de vermes crescidos, sem sinais de fragmentação recente, para os replicados preparados para a fase de eliminação (por exemplo dez organismos por recipiente replicado).

51. Caso apenas se utilize água como solvente, devem ser constituídos, pelo menos, 9 replicados de controlo negativo (colhendo-se amostras em, pelo menos, 3 no início do ensaio, 3 no final da fase de absorção e 3 no final da fase de eliminação) para análises biológicas e dos níveis de fundo. Se for utilizado um qualquer agente solubilizante para a aplicação da substância em estudo, é necessário proceder a um controlo do solvente (colheita de amostras em, pelo menos, 3 replicados no início da fase de absorção, 3 no final da fase de absorção e 3 no final da fase de eliminação). Nesse caso, devem ser preparados, pelo menos, 4 replicados de controlo negativo (sem solvente), para que neles sejam colhidas amostras no final da fase de absorção. A fim de obter informações sobre a eventual influência do solvente nos organismos sujeitos ao ensaio, pode efetuar-se uma comparação, em termos biológicos, entre estes últimos replicados e o controlo do solvente. Para mais pormenores, ver o apêndice 3.

▼M6

Frequência das determinações da qualidade da água

52. Durante a fase de absorção e a fase de eliminação, é necessário medir, pelo menos, os seguintes parâmetros de qualidade da água na água sobrenadante:

Temperatura	num recipiente correspondente a cada nível de exposição por data de colheita de amostras, num recipiente de controlo uma vez por semana, no início e no final do período de absorção e no início e no final do período de eliminação; pode igualmente registar-se a temperatura no meio circundante (ar ambiente ou banho de água) ou num recipiente de ensaio representativo, por exemplo de hora a hora ou continuamente;
Teor de oxigénio dissolvido	num recipiente correspondente a cada nível de exposição e num recipiente de controlo, por data de colheita de amostras, expresso em mg/l e em % do valor da saturação com ar (VSA);
Fornecimento de ar	a verificar pelo menos uma vez por dia (dias úteis) e a regular se necessário;
pH	num recipiente correspondente a cada nível de exposição por data de colheita de amostras, num recipiente de controlo uma vez por semana, no início e no final do período de absorção e no início e no final do período de eliminação;
Dureza total da água	pelo menos num recipiente exposto e num recipiente de controlo no início e no final do período de absorção e no início e no final do período de eliminação, expressa em mg de $CaCO_3$ por litro;
Teor total de amoníaco	pelo menos num recipiente exposto e num recipiente de controlo no início e no final do período de absorção e no início e no final do período de eliminação, expresso em mg de NH_4^+, NH_3 ou azoto amoniacal total por litro.

Colheita de amostras e análise dos vermes, dos sedimentos e da água

Programa de colheita de amostras

53. O apêndice 3 contém exemplos de programação da colheita de amostras para uma fase de absorção de 28 dias e uma fase de eliminação de 10 dias.

54. Antes da introdução dos vermes, durante a fase de absorção e durante a fase de eliminação, colhem-se amostras da água e dos sedimentos das câmaras de ensaio para determinar a concentração da substância em estudo. Durante o ensaio, determinam-se as concentrações da substância em estudo nos vermes, nos sedimentos e na água, para monitorizar a distribuição daquela pelos diversos compartimentos do sistema de ensaio.

55. Colhem-se amostras dos vermes, dos sedimentos e da água pelo menos seis vezes durante a fase de absorção e pelo menos seis vezes durante a fase de eliminação.

56. Prossegue-se a colheita de amostras até se atingir um patamar (estado estacionário, ver o apêndice 1) ou durante 28 dias. Se, depois de transcorridos 28 dias, o patamar não tiver sido atingido, dá-se início à fase de eliminação. No início desta fase, transferem-se os vermes a isso destinados para câmaras replicadas não quais já se introduziram água e sedimentos não-expostos (ver também os pontos 17 e 18).

Colheita e preparação das amostras

57. Colhem-se amostras de água decantando, sifonando ou pipetando um volume de água suficiente para determinar quantitativamente a substância em estudo na amostra.

58. Remove-se cuidadosamente, por decantação ou sifonagem, a restante água sobrenadante da câmara ou câmaras de ensaio. Colhem-se em seguida cuidadosamente amostras dos sedimentos, de modo a perturbar os vermes o mínimo possível.

▼M6

59. Retiram-se todos os vermes de cada replicado em causa no momento da colheita das amostras, por exemplo pondo os sedimentos em suspensão com a água sobrenadante, espalhando o conteúdo de cada replicado numa tina pouco profunda e recolhendo os vermes com uma pinça de aço flexível. Enxaguam-se rapidamente os vermes com água numa tina pouco profunda de vidro ou de aço. Elimina-se o excesso de água. Transferem-se os vermes cuidadosamente para um recipiente previamente tarado e determina-se o peso dos vermes. Matam-se os vermes por congelação (por exemplo ≤ -18 °C). Regista-se se estão presentes casulos e/ou animais jovens e o número respetivo.

60. Em geral, os vermes devem ser pesados e mortos imediatamente após a colheita das amostras, sem fase de purga intestinal, para obter fatores de bioacumulação prudentes, que incluam o conteúdo contaminado do intestino, e para evitar perdas de fluidos corporais durante uma eventual purga intestinal unicamente em água (8). Não é de esperar que as substâncias com log K_{ow} superior a 5 sejam significativamente eliminadas durante uma eventual purga intestinal unicamente em água; porém as perdas de substâncias com log K_{ow} inferior a 4 podem ser apreciáveis (47).

61. Durante a fase de eliminação, os vermes purgam o intestino nos sedimentos limpos. Significa isto que as medições efetuadas imediatamente antes da fase de eliminação incluem sedimentos intestinais contaminados, ao passo que, após as 4 a 24 horas iniciais da fase de eliminação, a maior parte do conteúdo intestinal contaminado foi supostamente substituído por sedimentos limpos (11)(47). Pode então considerar-se que a concentração nos vermes desta amostra é a concentração nos tecidos após purga intestinal. Para atender à diluição da concentração da substância em estudo por sedimentos não-contaminados verificada durante a fase de eliminação, pode estimar-se o peso do conteúdo intestinal a partir do quociente entre o peso húmido de vermes e o peso das cinzas dos vermes ou do quociente entre o peso seco de vermes e o peso das cinzas dos vermes.

62. Se o objetivo de um determinado estudo for medir a biodisponibilidade e os resíduos reais nos tecidos dos organismos em causa, será necessário pesar, pelo menos, uma subamostra dos animais expostos (proveniente, por exemplo, de três recipientes replicados suplementares), de preferência constituída em estado estacionário, purgá-la em água limpa durante 6 horas (47) e pesá-la novamente antes das análises. Em seguida, os dados de peso de vermes e de concentração corporal correspondentes a esta subamostra podem ser comparados com os valores obtidos para vermes não-purgados. Para minimizar a tensão dos animais, os vermes destinados à medição da eliminação não são purgados antes de serem transferidos para sedimentos limpos.

63. De preferência, analisam-se as amostras de água, de sedimentos e de vermes imediatamente após a colheita (ou seja, no prazo de 1 a 2 dias), a fim de evitar degradações ou outras perdas e de calcular as velocidades aproximadas de absorção e de eliminação no decurso do próprio ensaio. A análise imediata também permite identificar prontamente o início de um patamar.

64. Se não forem imediatamente analisadas, é necessário conservar as amostras em condições adequadas. Para isso, antes de iniciar o estudo, é importante obter informações sobre a estabilidade e as condições adequadas de conservação da substância em causa (por exemplo duração e temperatura de conservação, processos de extração etc.). Caso não se disponha dessas informações e se considere necessário obtê-las, podem ser estudados em paralelo tecidos enriquecidos de controlo, para determinar a estabilidade de conservação.

Qualidade do método analítico

65. Uma vez que, na sua globalidade, o método de ensaio é essencialmente condicionado pela exatidão, pela precisão e pela sensibilidade do método analítico utilizado para determinar a substância em estudo, é necessário verificar experimentalmente se a precisão e a reprodutibilidade da análise química, bem como a recuperação da substância em estudo a partir das

▼M6

amostras de água, de sedimentos e de vermes, se adequam ao método em causa. Importa ainda confirmar que a substância em estudo não é detetável nas câmaras de controlo em concentrações superiores ao nível de fundo. Se necessário, corrigem-se os valores de C_w (concentração na água), C_s (concentração nos sedimentos) e C_a (concentração nos vermes) em função das recuperações e dos valores de fundo correspondentes aos recipientes de controlo. Manipulam-se as amostras durante o ensaio de maneira a minimizar as contaminações e as perdas (resultantes, por exemplo, da adsorção da substância em estudo ao dispositivo de colheita de amostras).

66. Registam-se e indicam-se no relatório a recuperação global da substância em estudo e a recuperação da mesma nos vermes, nos sedimentos, na água e em eventuais armadilhas com absorventes para retenção da substância em estudo evaporada.

67. Uma vez que se recomenda a utilização de substâncias com marcação radioativa, pode analisar-se a radioatividade total (substância parental e produtos de degradação desta). Todavia, se for viável do ponto de vista analítico, a determinação quantitativa separada da substância parental e dos produtos de degradação em estado estacionário ou no final da fase de absorção pode fornecer informações importantes. Caso se pretenda realizar essas medições, será necessário submeter as amostras a processos de extração adequados, para que possa determinar-se quantitativamente a substância parental por si só. Recomenda-se que se proceda à identificação de cada produto de degradação que represente uma percentagem significativa (por exemplo > 10 %) da radioatividade medida nos organismos sujeitos ao ensaio, em estado estacionário ou no final da fase de absorção (5).

68. Dado que a biomassa de cada indivíduo é pequena, é frequente não ser possível determinar a concentração da substância em estudo em cada verme, a menos que se utilize no ensaio a espécie *Branchiura sowerbyi* (40-50 mg de peso líquido por verme) (11). Nesses casos, é aceitável que se reúnam os espécimes que integram a amostra colhida em cada recipiente de ensaio, separadamente para cada recipiente, mas este procedimento restringe os métodos estatísticos aplicáveis aos dados correspondentes. Se um determinado método estatístico e um determinado poder estatístico forem importantes, o ensaio terá de incidir num número de animais e/ou de câmaras de ensaio replicadas compatível com a reunião de espécimes e com o método e poder estatísticos pretendidos.

69. Recomenda-se que o fator de bioacumulação seja expresso em função do peso húmido total, do peso seco total e, quando necessário (por exemplo no caso de substâncias muito lipófilas), também em função do teor de lípidos e do teor de carbono orgânico total dos sedimentos. Na determinação do teor de lípidos devem ser utilizados métodos adequados (48)(49). Como método-padrão, pode recomendar-se a extração com clorofórmio/metanol (48)(50). No entanto, para evitar os solventes clorados, pode utilizar-se a versão modificada do método de Bligh e Dyer (50) descrita na referência (51), que foi objeto de um estudo interlaboratorial comparativo. Como os vários métodos não conduzem a resultados idênticos (48), importa explicar o método utilizado. Sempre que possível, isto é, quando se dispõe de tecido de vermes suficiente, determina-se o teor de lípidos na amostra ou extrato utilizado para a análise da substância em estudo, porquanto os lípidos têm frequentemente de ser removidos do extrato antes de este poder ser analisado cromatograficamente (5). Porém, para medir o teor de lípidos, é prático utilizar animais de controlo aclimatados, pelo menos no início ou, de preferência, no final da fase de absorção, por exemplo em três amostras.

DADOS E RELATÓRIOS

Tratamento dos resultados

70. Obtém-se a curva de absorção da substância em estudo exprimindo em função do tempo, numa escala aritmética, a concentração da substância

▼M6

nos vermes durante a fase de absorção. Se a curva tiver atingido um patamar, calcula-se do seguinte modo o fator de bioacumulação em estado estacionário (FBA_{EE}):

$$\frac{C_a \text{ em estado estacionário ou no dia 28 (média)}}{C_s \text{ em estado estacionário ou no dia 28 (média)}}$$

71. Determina-se o fator de bioacumulação cinético (FBA_k) como o quociente k_s/k_e. Normalmente, determina-se a constante de velocidade de eliminação (k_e) a partir da curva de eliminação (ou seja, da linha que representa a concentração da substância em estudo nos vermes durante a fase de eliminação). Em seguida, calcula-se a constante de velocidade de absorção, k_s, a partir da cinética da curva de absorção. Para obter o fator FBA_k e as constantes de velocidade k_s e k_e, é preferível recorrer a métodos informáticos de estimativa de parâmetros não-linear (ver o apêndice 2). Se, manifestamente, a curva de eliminação não obedecer a uma cinética de primeira ordem, devem ser utilizados modelos mais complexos (25)(27)(52).

72. Determina-se o fator de acumulação biota-sedimentos (FABS) por normalização do FBA_k em função do teor de lípidos dos vermes e do teor de carbono orgânico total dos sedimentos.

Interpretação dos resultados

73. Sempre que os valores determinados para as concentrações de ensaio sejam próximos do limite de deteção do método analítico utilizado, os resultados devem ser interpretados com precaução.

74. A obtenção de curvas de absorção e de eliminação bem definidas constitui um indicador de boa qualidade dos dados de bioacumulação. Em geral, em estudos bem concebidos, os limites de confiança dos valores do FBA não excedem 25 % (5).

Relatório do ensaio

75. Elementos a constar do relatório do ensaio:

Substância em estudo

— estado físico e propriedades físico-químicas, por exemplo log K_{ow} e hidrossolubilidade;

— dados de identificação química; proveniência da substância em estudo, identidade e concentração dos solventes eventualmente utilizados;

— em caso de marcação radioativa, localização exata dos átomos marcadores, radioatividade específica e percentagem de radioatividade associada a impurezas.

Espécies ensaiadas

— denominação científica, estirpe, origem, pré-tratamentos eventuais, aclimatação, idade, gama de dimensões etc.

Condições de realização do ensaio

— tipo de ensaio (estático, semiestático ou de fluxo contínuo);

— tipo e características da iluminação utilizada e fotoperíodo(s);

— protocolo do ensaio [por exemplo número, matéria e dimensão das câmaras de ensaio, volume de água, massa e volume de sedimentos, taxa de renovação da água (ensaios de fluxo contínuo ou semiestático), eventual arejamento antes do ensaio e durante o ensaio, número de replicados, número de vermes por replicado, número de concentrações ensaiadas, duração da fase de absorção e da fase de eliminação, frequência de colheita de amostras];

▼M6

— método de preparação e de aplicação da substância em estudo e razões da escolha desse método;

— concentrações nominais ensaiadas;

— origem dos componentes da água e dos sedimentos artificiais ou — caso se utilizem meios naturais — origem da água e dos sedimentos, descrição dos eventuais tratamentos prévios, resultados de eventuais demonstrações da capacidade dos animais sujeitos ao ensaio de viverem e/ou de se reproduzirem nos meios utilizados, características dos sedimentos [pH e teor de amoníaco da água dos poros (no caso dos sedimentos naturais), teor de carbono orgânico total, distribuição granulométrica (percentagem de areias, de limos e de argilas), percentagem de humidade e outras medições efetuadas] e características da água [pH, dureza, condutividade, temperatura, concentração de oxigénio dissolvido, teores de cloro residual (se for medido) e outras medições efetuadas];

— peso seco nominal e medido, em percentagem do peso húmido (ou razão peso seco/peso húmido), dos sedimentos artificiais; peso seco medido, em percentagem do peso húmido (ou razão peso seco/peso húmido), dos sedimentos naturais;

— qualidade da água nas câmaras de ensaio, caracterizada pela temperatura, pelo pH, pelo teor de amónio, pela dureza total e pela concentração de oxigénio dissolvido;

— informações pormenorizadas sobre o tratamento das amostras de água, de sedimentos e de vermes, nomeadamente elementos sobre a preparação, a conservação, o enriquecimento com a substância em estudo, a extração e as análises (incluindo a precisão destas) da substância em estudo e do teor de lípidos, bem como as recuperações da substância em estudo.

Resultados

— mortalidade dos vermes de controlo e dos vermes de cada câmara de ensaio e eventuais efeitos subletais observados, incluindo comportamentos anormais (por exemplo afastamento dos vermes relativamente aos sedimentos, presença ou ausência de excrementos, ausência de reprodução);

— peso seco medido, em percentagem do peso húmido (ou razão peso seco/peso húmido), dos sedimentos e dos organismos sujeitos ao ensaio (útil para a normalização);

— teor de lípidos dos vermes;

— curvas que evidenciem a cinética da absorção e da eliminação da substância em estudo nos vermes e tempo decorrido até ao estado estacionário;

— C_a, C_s e C_w (com o desvio-padrão e o intervalo de variação, se for caso disso) para todos os momentos de colheita de amostras (C_a expressa em g/kg de peso húmido e peso seco de todo o corpo, C_s expressa em g/kg de peso húmido e peso seco de sedimentos e C_w em mg/l). Se (por exemplo para comparação dos resultados de dois ou mais ensaios realizados em animais com teores de lípidos diferentes) for necessário um fator de acumulação biota-sedimentos (FABS, ver a definição no apêndice 1), C_a deve igualmente ser expressa em g/kg de lípidos do organismo e C_s em g/kg de carbono orgânico dos sedimentos;

— FBA (expresso em kg de sedimentos húmidos/kg de vermes húmidos), constante de velocidade de absorção a partir dos sedimentos, k_s (expressa em g de sedimentos húmidos/kg de vermes húmidos/dia) e constante de velocidade de eliminação, k_e (expressa em dia^{-1}); adicionalmente, pode indicar-se no relatório o fator de acumulação biota-sedimentos (FABS, expresso em kg de carbono orgânico dos sedimentos/kg de lípidos dos vermes);

▼**M6**

— resíduos não-eliminados no final da fase de eliminação;

— caso tenham sido medidas: percentagens da substância parental, dos produtos de degradação desta e dos resíduos ligados (ou seja, percentagem da substância em estudo que não pode ser extraída por métodos de extração correntes) detetadas nos animais sujeitos ao ensaio;

— métodos utilizados na análise estatística dos dados.

Avaliação dos resultados

— coerência dos resultados com os critérios de validade enumerados no ponto 21;

— resultados inesperados ou inabituais, por exemplo eliminação incompleta da substância em estudo pelos animais sujeitos ao ensaio; nesses casos, os resultados de estudos preliminares podem fornecer informações úteis.

▼M6

Apêndice 1

Definições e unidades

Sedimentos artificiais, formulados, reconstituídos ou sintéticos são uma mistura de matérias utilizadas para simular os componentes de sedimentos naturais.

Bioacumulação é o aumento que a concentração da substância em estudo sofre num organismo, relativamente à concentração da substância no meio circundante. A bioacumulação resulta dos processos de bioconcentração e de bioamplificação (ver adiante).

O **fator de bioacumulação** (FBA) em qualquer momento da fase de absorção deste ensaio de bioacumulação é o quociente entre a concentração da substância em estudo no organismo sujeito ao ensaio (C_a — em g por kg de peso húmido ou seco) e a concentração da substância no meio circundante (C_s — em g por kg de peso húmido ou seco de sedimentos). Por razões de coerência com as unidades de C_a e de C_s, a unidade do fator de bioacumulação é kg de sedimentos por kg de verme (15).

Quando calculado diretamente pelo quociente entre a constante de velocidade de absorção a partir dos sedimentos e a constante de velocidade de eliminação (respetivamente k_s e k_e — ver adiante), o **fator de bioacumulação** é designado por fator de bioacumulação cinético (FBA_k).

Bioconcentração é o aumento que a concentração da substância em estudo sofre num organismo, exclusivamente por absorção através da superfície do corpo, relativamente à concentração da substância no meio circundante.

Bioamplificação é o aumento que a concentração da substância em estudo sofre num organismo, sobretudo em consequência de absorção a partir de alimentos ou de presas contaminados, relativamente à concentração da substância nesses alimentos ou presas. A bioamplificação pode conduzir à transferência ou à acumulação da substância em estudo nas redes tróficas.

Fator de acumulação biota-sedimentos (FABS) é o quociente entre a concentração em estado estacionário da substância em estudo no organismo sujeito ao ensaio, normalizada relativamente ao teor de lípidos, e a concentração em estado estacionário da substância nos sedimentos, normalizada relativamente ao teor de carbono orgânico. Por conseguinte, C_a é expressa em g por kg de lípidos do organismo e C_s em g por kg de carbono orgânico dos sedimentos.

O **período de condicionamento** serve para estabilizar a componente microbiana dos sedimentos e remover, por exemplo, o amoníaco proveniente dos componentes dos sedimentos; antecede o enriquecimento dos sedimentos com a substância em estudo. Em geral, depois do condicionamento descarta-se a água sobrenadante.

Eliminação de uma substância em estudo é a perda dessa substância pelos tecidos do organismo sujeito ao ensaio, mediante processos ativos ou passivos, perda essa que ocorre independentemente da presença ou ausência da substância no meio circundante.

Fase de eliminação é o período, após a transferência dos organismos sujeitos ao ensaio de um meio contaminado para um meio isento da substância em estudo, durante o qual é estudada a eliminação (ou perda líquida) da substância por esses organismos.

Constante de velocidade de eliminação (k_e) é o valor numérico que define a taxa de redução da concentração da substância em estudo no organismo sujeito ao ensaio, depois da transferência dos organismos de um meio que contém a substância em estudo para um meio dela isento; k_e é expressa em d^{-1}.

▼**M6**

O **período de equilibração** serve para possibilitar a repartição da substância em estudo pela fase sólida, pela água dos poros e pela água sobrenadante; ocorre após o enriquecimento dos sedimentos com a substância em estudo e antes da adição dos organismos sujeitos ao ensaio.

Coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}, por vezes também representado por P_{ow}) é o quociente entre a solubilidade da substância em *n*-octanol e a hidrossolubilidade da mesma substância, em condições de equilíbrio. O logaritmo de K_{ow} (log K_{ow}) é utilizado como indicador do potencial de bioacumulação de substâncias em organismos aquáticos.

Coeficiente de partição carbono orgânico-água (K_{co}) é o quociente entre a concentração da substância na fração de carbono orgânico dos sedimentos e a concentração da substância na água, em condições de equilíbrio.

Água sobrenadante é a água à superfície dos sedimentos, no recipiente de ensaio.

Patamar ou **estado estacionário** é o equilíbrio atingido entre os processos de absorção e de eliminação que ocorrem simultaneamente durante a fase de exposição. No gráfico do FBA correspondente a cada período a que se reporta uma colheita de amostras, em função do tempo, atinge-se o estado estacionário quando a curva se torna uma linha paralela ao eixo do tempo e três cálculos sucessivos do FBA, em amostras colhidas a intervalos de, pelo menos, dois dias entre elas, não diferem mais de 20 % entre si, sem que haja diferenças com significância estatística entre os três períodos a que se reportam as colheitas de amostras. No caso de substâncias de absorção lenta, são mais adequados intervalos de sete dias (5).

Água dos poros ou água intersticial é a água que ocupa o espaço entre as partículas de sedimentos ou de solo.

Constante de velocidade de absorção a partir dos sedimentos (k_s) é o valor numérico que define a taxa de aumento da concentração da substância em estudo no organismo sujeito ao ensaio, em resultado de absorção em proveniência dos sedimentos; k_s é expressa em g de sedimentos por kg de vermes por dia.

Sedimentos enriquecidos são sedimentos aos quais foi adicionada a substância em estudo.

Fator de bioacumulação em estado estacionário (FBA_{ee}) é o fator de bioacumulação nesse estado; não sofre variação significativa ao longo de um período prolongado, durante o qual a concentração da substância em estudo no meio circundante (C_s — em g por kg de peso húmido ou seco de sedimentos) se mantém constante.

Fase de absorção ou de exposição é o período durante o qual os organismos sujeitos ao ensaio estão expostos à substância em estudo.

▼M6

Apêndice 2

Cálculo dos parâmetros de absorção e de eliminação

O principal parâmetro de um ensaio de bioacumulação é o fator de bioacumulação — FBA. Pode calcular-se o fator de bioacumulação dividindo a concentração da substância em estudo no organismo sujeito ao ensaio, C_a, pela concentração da substância em estudo nos sedimentos, C_s, em estado estacionário. Caso não se atinja um estado estacionário na fase de absorção, calcula-se o FBA da mesma maneira para o dia 28. Deve, porém, indicar-se se o FBA se baseia ou não em concentrações no estado estacionário.

A via preferida para a obtenção do fator de bioacumulação cinético (FBA_k), da constante de velocidade de absorção a partir dos sedimentos (k_s) e da constante de velocidade de eliminação (k_e) é o recurso a métodos informáticos de estimativa de parâmetros não-linear. A partir de uma série temporal de fatores de acumulação médios (valores médios de C_a correspondentes a cada data de colheita de amostras/valores médios de C_s correspondentes a cada data de colheita de amostras = FA) da fase de absorção, com base no peso húmido dos vermes e dos sedimentos e na equação de modelo

$$AF(t) = FBA \times (1 - e^{ke \times t}) \qquad \text{[equação 1]}$$

em que AF(t) é a razão entre a concentração da substância em estudo nos vermes e a concentração da substância em estudo nos sedimentos no instante t da fase de absorção, os programas informáticos utilizados calculam valores de FBA_k, k_s e k_e.

Se, durante a fase de absorção, for atingido o estado estacionário (ou seja, se t = ∞), a equação 1 pode simplificar-se do seguinte modo:

$$FBA_K = \frac{k_s}{k_e} \qquad \text{[equação 2]}$$

em que:

k_s = constante de velocidade de absorção dos tecidos [expressa em g de sedimentos por kg de vermes por dia];

k_e = constante de velocidade de eliminação [dia^{-1}].

Nestas condições, $k_s/k_e \times C_s$ é uma aproximação da concentração da substância em estudo nos tecidos dos vermes em estado estacionário ($C_{a,ee}$).

Calcula-se o fator de acumulação biota-sedimentos (FABS) do seguinte modo:

$$FABS = FBA_K \times \frac{f_{oc}}{f_{lip}}$$

em que f_{co} é a fração de carbono orgânico dos sedimentos e f_{lip} é a fração de lípidos dos vermes, ambos com base no peso seco ou no peso húmido.

Dispondo de uma série temporal de valores de concentração, pode estabelecer-se um modelo da cinética de eliminação utilizando as equações de modelo a seguir indicadas e recorrendo a um método informático de estimativa de parâmetros não-linear.

Salvo indicação em contrário, recomenda-se que o ponto de partida seja o valor médio do resíduo corporal medido no final da fase de absorção. Apenas deve utilizar-se o valor modelado/estimado a partir da fase de absorção se, por exemplo, o valor medido se desviar significativamente do resíduo corporal previsto no modelo. Ver igualmente no ponto 50 uma alternativa de exposição prévia dos vermes destinados à fase de eliminação. Nessa abordagem, considera-se que as amostras desses vermes pré-expostos colhidas no dia 0 da fase de eliminação fornecem valores realistas dos resíduos corporais, para servirem de ponto de partida da cinética de eliminação.

▼M6

Se o traçado gráfico dos dados em função do tempo indicar um decréscimo exponencial constante da concentração da substância em estudo nos animais, pode utilizar-se um modelo monocompartimental (equação 4) para descrever a eliminação ao longo do tempo.

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k_e t} \qquad \text{[equação 3]}$$

Os processos de eliminação revelam-se por vezes bifásicos, com rápido decréscimo de C_a no início da eliminação e perda mais lenta da substância em estudo no final desta (8)(19)(25). Estas duas fases podem ser interpretadas admitindo que há dois compartimentos distintos no organismo, que eliminam a velocidades diferentes a substância em estudo. Nesses casos, deve consultar-se literatura específica (15)(16)(17)(25).

Esta eliminação bicompartimental pode ser descrita, por exemplo, pela seguinte equação (25):

$$C_a = A \times e^{-k_a \times t} + B \times e^{k_b \times t} \qquad \text{[equação 4]}$$

em que A e B representam a dimensão dos compartimentos (em percentagem do resíduo total nos tecidos), sendo A o compartimento que elimina rapidamente a substância em estudo e B o compartimento que a elimina lentamente. A soma de A e B corresponde a 100 % do volume total do compartimento animal em estado estacionário; k_a e k_b representam as constantes de eliminação correspondentes [d^{-1}]. Se o modelo bicompartimental se ajustar aos dados de depuração, pode determinar-se a constante de velocidade de absorção, k_s, do seguinte modo (53)(54):

$$k_s = \frac{(A \times k_a + B \times k_b) \times FBA}{A + B} \qquad \text{[equação 5]}$$

Estas equações de modelo devem, porém, ser utilizadas com precaução, em especial se, durante o ensaio, ocorrerem alterações da biodisponibilidade da substância em estudo (42).

Em alternativa ao recurso às equações de modelo *supra*, os parâmetros cinéticos (k_s e k_e) também podem ser calculados de uma só vez, aplicando o modelo de cinética de primeira ordem simultaneamente a todos os dados da fase de absorção e da fase de eliminação. Para a descrição de um método que permite esse cálculo combinado das constantes de velocidade de absorção e de eliminação, consultem-se as referências (55), (56) e (57).

Calculam-se os resíduos não-eliminados (RNE), como parâmetro secundário, multiplicando por 100 a razão entre a concentração média nos vermes (C_a) no dia 10 da fase de eliminação e a concentração média nos vermes (C_a) em estado estacionário (dia 28 da fase de absorção):

$$\boldsymbol{RNE_{10d}[\%] = \frac{C_a \textit{ no final da eliminação}(\textit{media}) \times 100}{C_a \textit{ em estado estacionário}(\textit{media})}}$$

▼M6

Apêndice 3

Exemplo de um programa de colheita de amostras num ensaio de bioacumulação com a duração de 28 dias

a) **Fase de absorção (incluindo uma fase de equilibração de 4 dias)**

Dia	Ações
-6	Preparação de uma suspensão de turfa para os sedimentos; condicionamento da suspensão durante 48 h.
-4	Enriquecimento dos sedimentos ou de uma fração dos sedimentos; mistura dos componentes dos sedimentos; colheita de amostras de sedimentos dos sedimentos expostos e dos sedimentos do controlo do solvente para determinação da concentração da substância em estudo; adição da água sobrenadante; incubação nas condições de realização do ensaio (fase de equilibração).
-3/-2	Separação, da cultura, dos organismos destinados ao ensaio, para aclimatação.
0	Medição da qualidade da água (ver o ponto 52); separação de replicados para colheita de amostras de água e de sedimentos para determinação da concentração da substância em estudo; distribuição aleatória dos vermes pelas câmaras de ensaio; conservação de um número de subamostras de vermes suficiente para a determinação dos valores analíticos de fundo; verificação da alimentação de ar, caso se utilize um sistema de ensaio fechado.
1	Separação de replicados para colheita de amostras; verificação da alimentação de ar, do comportamento dos vermes, da qualidade da água (ver o ponto 56); colheita de amostras de água, de sedimentos e de vermes para determinação da concentração da substância em estudo.
2	Verificação da alimentação de ar, do comportamento dos vermes e da temperatura.
3	O mesmo que no dia 1.
4 — 6	O mesmo que no dia 2.
7	O mesmo que no dia 1; compensação da água evaporada, se necessário.
8 — 13	O mesmo que no dia 2.
14	O mesmo que no dia 1; compensação da água evaporada, se necessário.
15 — 20	O mesmo que no dia 2.
21	O mesmo que no dia 1; compensação da água evaporada, se necessário.
22 — 27	O mesmo que no dia 2.
28	O mesmo que no dia 1; medição da qualidade da água (ver o ponto 52); termo da fase de absorção; conservação de um número de subamostras de vermes suficiente para a determinação dos valores analíticos de fundo, do peso húmido, do peso seco e do teor de lípidos; transferência dos vermes dos replicados expostos restantes para os recipientes com sedimentos limpos destinados à fase de eliminação (sem purga intestinal); colheita de amostras de água, de sedimentos e de vermes dos recipientes de controlo do solvente; colheita de amostras das soluções de retenção, se for caso disso.
	Na programação das ações anteriores à exposição (fase de estabelecimento do equilíbrio) devem ser tidas em conta as propriedades da substância em estudo. Se necessário, condicionam-se durante 7 dias os sedimentos preparados, mantendo-os cobertos com uma camada de água sobrenadante a 20 °C ± 2 °C; nesse caso, é necessário preparar previamente os sedimentos.
	As ações descritas para o dia 2 devem ser executadas diariamente (pelo menos nos dias úteis).

▼**M6**

b) **Fase de eliminação**

Dia	Ações
-6	Preparação de uma suspensão de turfa para os sedimentos; condicionamento da suspensão durante 48 h.
-4	Mistura dos componentes dos sedimentos; colheita de amostras de sedimentos dos sedimentos expostos e dos sedimentos do controlo do solvente para determinação da concentração da substância em estudo; adição da água sobrenadante; incubação nas condições de realização do ensaio.
0 (dia 28 da fase de absorção)	Medição da qualidade da água (ver o ponto 52); transferência dos vermes dos replicados expostos restantes para recipientes com sedimentos limpos; após **4 a 6 horas**, separação de replicados para colheita de amostras de água, de sedimentos e de vermes para determinação da concentração da substância em estudo; distribuição aleatória dos vermes pelas câmaras de ensaio.
1	Separação de replicados para colheita de amostras; verificação da alimentação de ar, do comportamento dos vermes, da qualidade da água (ver o ponto 52); colheita de amostras de água, de sedimentos e de vermes para determinação da concentração da substância em estudo.
2	Verificação da alimentação de ar, do comportamento dos vermes e da temperatura.
3	O mesmo que no dia 1.
4	O mesmo que no dia 2.
5	O mesmo que no dia 1.
6	O mesmo que no dia 2.
7	O mesmo que no dia 1; compensação da água evaporada, se necessário.
8 — 9	O mesmo que no dia 2.
10	O mesmo que no dia 1; termo da fase de eliminação; medição da qualidade da água (ver o ponto 52); colheita de amostras de água, de sedimentos e de vermes dos recipientes de controlo do solvente; colheita de amostras das soluções de retenção, se for caso disso.
	A preparação dos sedimentos antes do início da fase de eliminação deve ser realizada do mesmo modo que a preparação dos sedimentos antes do início da fase de absorção.
	As ações descritas para o dia 2 devem ser executadas diariamente (pelo menos nos dias úteis).

▼**M6**

Apêndice 4

Algumas características físico-químicas de uma água de diluição aceitável

COMPONENTE	CONCENTRAÇÃO
Partículas	< 20 mg/l
Carbono orgânico total	< 2 µg/l
Amoníaco não-ionizado	< 1 µg/l
Cloro residual	< 10 µg/l
Pesticidas organofosforados totais	< 50 ng/l
Soma dos pesticidas organoclorados e dos bifenilos policlorados, totais	< 50 ng/l
Cloro orgânico total	< 25 ng/l

COMPOSIÇÃO DA ÁGUA RECONSTITUÍDA RECOMENDADA

a) Solução de cloreto de cálcio

Dissolvem-se em água desionizada 11,76 g de $CaCl_2 \times 2H_2O$; completa-se o volume até 1 litro com água desionizada.

b) Solução de sulfato de magnésio

Dissolvem-se em água desionizada 4,93 g de $MgSO_4 \times 7H_2O$; completa-se o volume até 1 litro com água desionizada.

c) Solução de bicarbonato de sódio

Dissolvem-se em água desionizada 2,59 g de $NaHCO_3$; completa-se o volume até 1 litro com água desionizada.

d) Solução de cloreto de potássio

Dissolvem-se em água desionizada 0,23 g de KCl; completa-se o volume até 1 litro com água desionizada.

Os produtos químicos devem ser todos de qualidade analítica.

A condutividade da água destilada ou desionizada não deve exceder 10 μScm^{-1}.

Misturam-se 25 ml de cada uma das soluções a) a d) e completa-se o volume até 1 litro com água desionizada. A soma da concentração dos iões cálcio e da concentração dos iões magnésio nesta solução é de 2,5 mmol/l.

A relação entre os iões Ca e Mg é de 4:1; entre os iões Na e K, é de 10:1. A capacidade ácida $K_{S\ 4,3}$ desta solução é de 0,8 mmol/l.

Areja-se a água de diluição até esta ficar saturada de oxigénio; em seguida, conserva-se durante aproximadamente dois dias, sem mais arejamento, até ser utilizada.

Para uma água de diluição ser aceitável, o seu pH tem de estar compreendido entre 6 e 9.

▼M6

Apêndice 5

Sedimentos artificiais — recomendações relativas à preparação e à conservação

Contrastando com o estabelecido no caso do método de ensaio C.8 (40), recomenda-se que o teor de turfa dos sedimentos artificiais seja de 2 %, em vez de 10 %, do peso húmido, de modo a corresponder ao que seria um teor orgânico baixo a moderado no caso de sedimentos naturais (58)

Percentagens dos componentes secos de sedimentos artificiais:

Componente	Características	Percentagem dos sedimentos secos
Turfa	Turfa de *Sphagnum* com grau de decomposição médio, seca ao ar, sem restos visíveis de plantas, finamente moída (granulometria ≤ 0,5 mm)	2 ± 0,5
Areia quartzítica	Granulometria: ≤ 2 mm, mas >50 % das partículas de granulometria na gama 50-200 µm	76
Argila caulínica	Teor de caulinite ≥ 30 %	22 ± 1
Fonte alimentar	*Folia urticae*, folhas de *Urtica sp.* (urtiga comum) finamente moídas (granulometria ≤ 0,5 mm) ou mistura (1:1) de folhas moídas de *Urtica sp.* com alfa-celulose; conformes com as normas farmacêuticas para consumo humano; suplemento aos sedimentos secos	0,4 — 0,5 %
Carbonato de cálcio	$CaCO_3$ pulverizado quimicamente puro; suplemento aos sedimentos secos	0,05 — 1
Água desionizada	Condutividade ≤ 10 µS/cm; suplemento aos sedimentos secos	30 — 50

Caso seja de esperar uma concentração elevada de amoníaco, por exemplo se a substância em estudo for reconhecidamente inibidora da nitrificação, pode ser útil substituir 50 % do pó de urtiga, rico em azoto, por celulose (por exemplo α--celulose em pó quimicamente pura com granulometria ≤ 0,5 mm).

Preparação

Seca-se a turfa ao ar e mói-se até se obter um pó fino (granulometria ≤ 0,5 mm, sem restos visíveis de plantas). Utilizando um dispositivo homogeneizador de elevada eficácia, prepara-se uma suspensão da quantidade necessária de turfa em pó em parte da água desionizada a adicionar aos sedimentos secos [verificou-se que um volume de água equivalente a 11,5 vezes o peso seco de turfa permite obter uma suspensão de turfa que pode misturar-se (8)].

Ajusta-se o pH desta suspensão a 5,5 ± 0,5 com $CaCO_3$. Condiciona-se a suspensão durante, pelo menos, dois dias, com agitação ligeira a 20 °C ± 2 °C, para estabilizar o pH e estabelecer um perfil microbiano estável. Determina-se outra vez o pH e, se necessário, ajusta-se a 6,0 ± 0,5 com $CaCO_3$. Em seguida, mistura-se a totalidade da suspensão com os outros componentes secos, não esquecendo a parte eventualmente utilizada para o enriquecimento. Adiciona-se a água desionizada restante e homogeneízam-se os sedimentos. Determina-se uma vez mais o pH e, se necessário, ajusta-se este entre 6,5 e 7,5 com $CaCO_3$. No entanto, se for de esperar formação de amoníaco, pode ser útil manter o pH dos sedimentos abaixo de 7,0 (por exemplo entre 6,0 e 6,5). Colhem-se amostras dos sedimentos para determinar o peso seco e o teor de carbono orgânico. Se for de esperar formação de amoníaco, os sedimentos artificiais podem ser mantidos durante sete dias em condições idênticas às do ensaio ulterior (por exemplo relação 1:4 entre os sedimentos e a água e espessura da camada de sedimentos como nos recipientes de ensaio) antes de os enriquecer com a substância em estudo — os sedimentos devem ser cobertos com água e esta deve ser arejada. Terminado o período de condicionamento, remove-se e descarta-se a água sobrenadante. Colhem-se amostras (por exemplo três) dos sedimentos para determinar o peso seco e o teor de carbono orgânico total.

▼M6

Em seguida, mistura-se a areia quartzítica enriquecida com os sedimentos, para cada nível de exposição, distribuem-se os sedimentos daí resultantes pelos recipientes de ensaio replicados e acrescenta-se-lhes água, da água utilizada para o ensaio (por exemplo relação 1:4 entre os sedimentos e a água e espessura da camada de sedimentos como nos recipientes de ensaio). Incubam-se depois os recipientes em condições idênticas às do ensaio ulterior. Inicia-se aqui o período de estabelecimento do equilíbrio. Areja-se a água sobrenadante.

Adiciona-se a fonte alimentar escolhida antes do enriquecimento dos sedimentos com a substância em estudo ou durante este enriquecimento. Pode misturar-se a fonte alimentar no início, com a suspensão de turfa (ver acima). No entanto, para evitar uma degradação excessiva da fonte alimentar antes da adição dos organismos sujeitos ao ensaio — por exemplo no caso de um período longo de estabelecimento de equilíbrio –, pode reduzir-se ao mínimo possível o período compreendido entre a adição dos alimentos e o início da exposição. Para que os alimentos e a substância em estudo estejam suficientemente em contacto, deve misturar-se a fonte alimentar com os sedimentos o mais tardar no dia do enriquecimento dos sedimentos com a dita substância. Admitem-se exceções se a duração do período de estabelecimento de equilíbrio provocar uma degradação microbiana excessiva dos alimentos antes da adição dos organismos sujeitos ao ensaio. Colhem-se amostras dos sedimentos (por exemplo três dos sedimentos enriquecidos e três dos sedimentos de controlo) para determinar o peso seco e o teor de carbono orgânico total.

O peso seco dos componentes (turfa, areia, caulino) deve ser expresso em grama e em percentagem do peso seco total.

O volume de água a adicionar aos componentes secos durante a preparação dos sedimentos também deve ser expresso em percentagem do peso seco total (por exemplo «100 % de peso seco + 46 % de água» significa que são adicionados 460 ml de água a 1 000 g de peso seco, daí resultando 1 460 g de sedimentos húmidos).

Conservação

Os componentes secos dos sedimentos artificiais podem ser conservados num local seco e fresco, à temperatura ambiente. Os sedimentos húmidos, uma vez preparados, podem ser conservados (unicamente para utilização ulterior em cultura) na obscuridade, a 4 °C ± 2 °C, durante 2 a 4 semanas a contar do dia da preparação (8).

Utilizam-se de imediato os sedimentos enriquecidos com a substância em estudo, a menos que haja indicações de que os sedimentos em questão podem ser conservados sem afetar a toxicidade e a biodisponibilidade da substância em causa. As amostras de sedimentos enriquecidos podem ser conservadas, respeitando as condições recomendadas para a substância em estudo, até à realização das análises.

▼M6

Apêndice 6

Espécies de oligoquetas recomendadas para ensaios de bioacumulação

***Tubifex tubifex* (MÜLLER), Tubificidae, Oligochaeta**

O oligoqueta tubificídeo (Tubificidae, Oligochaeta) *Tubifex tubifex* (Müller) vive em sedimentos da água doce, em tubos revestidos de muco. Os vermes alojam-se de cabeça para baixo nesses tubos e ingerem partículas dos sedimentos, alimentando-se dos detritos orgânicos e microrganismos associados a estes últimos. A parte posterior do animal geralmente ondula na água sobrenadante, postura associada à respiração. Embora esta espécie viva numa grande diversidade de sedimentos em todo o hemisfério norte, a *Tubifex tubifex* prefere granulometrias relativamente finas (59). As razões da adequação desta espécie aos ensaios ecotoxicológicos são descritas, por exemplo, em (8)(29)(31)(39)(60)(62)(63).

Métodos de cultura

A fim de se dispor de um número suficiente de *Tubifex tubifex* para a realização dos ensaios de bioacumulação, é necessário manter no laboratório uma cultura permanente destes vermes. Para a cultura de *Tubifex tubifex*, recomenda-se um sistema constituído por sedimentos artificiais obtidos a partir do solo artificial descrito no método de ensaio C.8 (40) e de água reconstituída de acordo com o método de ensaio C.1 (8).

Como recipientes de cultura, podem ser utilizados recipientes de vidro ou de aço inoxidável com 12 cm a 20 cm de altura. Coloca-se em cada recipiente de cultura uma camada de sedimentos artificiais húmidos preparados de acordo com o apêndice 5. A espessura da camada de sedimentos deve ser suficiente para que os vermes possam expressar o seu comportamento normal de enterramento (no caso da *Tubifex tubifex*, a espessura mínima dos sedimentos é de 2 cm). Adiciona-se água reconstituída ao sistema. Devem ser tomadas as precauções necessárias para minimizar a perturbação dos sedimentos. Areja-se suavemente a camada de água (por exemplo duas bolhas por segundo de ar filtrado a 0,45 μm), inserindo a ponta de uma pipeta de Pasteur 2 cm acima da superfície dos sedimentos. A temperatura de cultura recomendada é de 20 °C ± 2 °C.

A densidade máxima dos vermes transferidos para o meio de cultura é de 20 000 indivíduos por metro quadrado de superfície de sedimentos. Densidades maiores podem reduzir as taxas de crescimento e de reprodução (43).

Nas culturas realizadas em sedimentos artificiais, é necessário alimentar os vermes. Um regime constituído por um alimento para peixes finamente moído, por exemplo TetraMin®, pode fornecer os nutrientes adicionais necessários — (8) e comunicação pessoal de Klerks, 1994. A quantidade e a frequência da alimentação devem ser suficientes para o crescimento e a reprodução dos vermes e reduzir ao mínimo a formação de amoníaco e o crescimento fúngico no meio de cultura. O alimento pode ser fornecido duas vezes por semana (por exemplo 0,6 mg a 0,8 mg por cm^2 de superfície de sedimentos). A experiência prática mostrou que o fornecimento do alimento sob a forma de uma suspensão homogénea em água desionizada pode facilitar uma distribuição homogénea do mesmo pela superfície dos sedimentos nos recipientes de cultura.

A fim de evitar a acumulação de amoníaco, é necessário renovar a água sobrenadante recorrendo a um sistema de fluxo contínuo ou manualmente, neste último caso pelo menos uma vez por semana. Os sedimentos das culturas de reserva devem ser substituídos de três em três meses.

No caso de apenas se pretenderem animais adultos, a colheita de vermes do meio de cultura pode realizar-se por tamisagem dos sedimentos através de um crivo com 1 mm de malha. Para reter os casulos, é adequada uma malha de 0,5 mm; para reter os vermes juvenis, uma malha de 0,25 mm. Depois da passagem dos sedimentos através dos crivos, estes podem ser colocados em água reconstituída. Os vermes saem dos crivos e podem ser recolhidos da água com uma pinça de aço flexível ou com uma pipeta cuja extremidade tenha sido embotada a quente.

▼M6

Para iniciar ensaios ou novas culturas apenas se utilizam espécimes intactos e claramente identificados de *Tubifex tubifex* [por exemplo (64)]. Descartam-se os vermes doentes ou lesionados e os casulos atacados por hifas fúngicas.

Uma cultura sincronizada pode fornecer vermes da idade e com a periodicidade pretendidas. Constituem-se novos recipientes de cultura com a periodicidade pretendida (por exemplo de duas em duas semanas), iniciando a cultura com animais de uma determinada idade (por exemplo casulos). Nas condições de cultura aqui descritas, os vermes atingem o estádio adulto após 8 a 10 semanas. Pode efetuar-se a colheita nas culturas quando os vermes tiverem gerado novos casulos, por exemplo após 10 semanas. Os adultos colhidos podem ser utilizados nos ensaios; os casulos, para iniciar novas culturas.

***Lumbriculus variegatus* (MÜLLER), Lumbriculidae, Oligochaeta**

A espécie *Lumbriculus variegatus* (Lumbriculidae, Oligochaeta) também vive em sedimentos da água doce, tem uma distribuição planetária e é amplamente utilizada em ensaios ecotoxicológicos. As referências (1)(6)(9)(36) contêm informações sobre a biologia, as condições de cultura e a sensibilidade desta espécie. Embora com algumas limitações, a *Lumbriculus variegatus* também pode ser cultivada nos sedimentos artificiais recomendados para a *Tubifex tubifex* de acordo com a referência (8). Uma vez que, na natureza, a *Lumbriculus variegatus* prefere sedimentos mais grosseiros que a *Tubifex tubifex* (59), as culturas laboratoriais nos sedimentos artificiais utilizados para a *Tubifex tubifex* podem cessar após 4 a 6 meses. A experiência prática mostrou que a *Lumbriculus variegatus* pode ser mantida vários anos sem renovação do substrato num sistema de fluxo contínuo com substrato arenoso (por exemplo areia quartzítica ou gravilha fina), utilizando como fonte nutricional um alimento para peixes. Uma vantagem importante da *Lumbriculus variegatus* em relação às outras espécies de oligoquetas aquáticos é a rapidez da sua reprodução, que faz aumentar rapidamente a biomassa das populações cultivadas em laboratório (1)(6)(9)(10).

Métodos de cultura

As referências Phipps *et al.* (1993) (10), Brunson *et al.* (1998) (28), ASTM (2000) (1) e U.S. EPA (2000) (6) descrevem pormenorizadamente as condições de cultura da *Lumbriculus variegatus*. Resumem-se brevemente a seguir essas condições.

Estes vermes podem ser cultivados em aquários grandes (57-80 litros), à temperatura de 23 °C, com um fotoperíodo de 16 horas de luz seguidas de 8 horas de escuridão (100-1 000 lux) e renovando todos os dias a água natural utilizada (45--50 litros por aquário). Prepara-se o substrato cortando em tiras toalhetes de papel pardo não branqueado, que podem em seguida ser misturadas com a água de cultura durante alguns segundos, de modo a obter pequenos pedaços de substrato de papel. Este substrato pode ser diretamente utilizado nos aquários de cultura de *Lumbriculus*, cobrindo com ele o fundo do recipiente, ou ser conservado congelado em água desionizada, para utilização ulterior. Em geral, um substrato novo introduzido num recipiente tem a duração de cerca de dois meses.

Inicia-se cada cultura de vermes com 500 a 1 000 indivíduos e fornecem-se-lhe como alimento, três vezes por semana, 10 ml de uma suspensão com 6 g de alimento inicial para trutas, num sistema com renovação ou de fluxo contínuo. A alimentação das culturas estáticas ou semiestáticas deve ser mais escassa e menos frequente, para evitar a proliferação de bactérias e de fungos. É necessário analisar o alimento e o substrato de papel para verificar se neles estão presentes as substâncias utilizadas nos ensaios de bioacumulação.

Nestas condições, o número de indivíduos na cultura geralmente duplica em 10 a 14 dias.

Os espécimes de *Lumbriculus variegatus* podem ser retirados da cultura, por exemplo, transferindo substrato com uma rede de malha fina, ou os próprios organismos com uma pipeta de vidro de ponta larga (cerca de 5 mm de diâmetro) embotada a quente, para um copo. Caso se transfira também substrato para esse

▼M6

copo, deixa-se o copo com os vermes e o substrato de um dia para o outro em condições de fluxo contínuo, que permitirão remover o substrato do copo e deixarão os vermes no fundo do recipiente. Em seguida, os vermes podem ser transferidos para recipientes de cultura recém-preparados ou ser aprontados para o ensaio, como se descreve em (1) e (6). Há que evitar lesionar os vermes ou provocar-lhes reações de autotomia, manipulando-os para isso com pipetas de extremidade embotada a quente ou com pinças de aço inoxidável.

Um aspeto a que deve ser dada especial atenção quando se utiliza a *Lumbriculus variegatus* em ensaios de bioacumulação em sedimentos é o modo de reprodução desta espécie (arquitomia seguida de morfalaxia). Este modo de reprodução assexual origina dois fragmentos, que não se alimentam enquanto a cabeça ou a cauda não forem regeneradas [por exemplo (36)(37)]. Significa isto que, quando se utiliza a *Lumbriculus variegatus*, a absorção de sedimentos e contaminantes por ingestão pode não ocorrer continuamente, ao contrário do que sucede no caso dos tubificídeos, que não se reproduzem por fragmentação.

É, pois necessária, uma sincronização, para minimizar processos de reprodução e de regeneração descontrolados, que redundariam em grande variabilidade dos resultados dos ensaios. As variações a que se alude podem ocorrer quando alguns indivíduos, por se terem fragmentado e, portanto, não se alimentarem durante um certo tempo, são menos expostos à substância em estudo do que outros, que não se fragmentaram durante o ensaio — ver, por exemplo, (38). Fragmentam-se os vermes artificialmente (sincronização) 10 dias a 14 dias antes do início da exposição (65). Utilizam-se vermes crescidos, de preferência sem sinais de fragmentação recente. Esses vermes podem ser colocados numa lâmina de vidro juntamente com uma gota da água de cultura, seccionando-os em seguida com um bisturi ao nível da região média do corpo. É necessário que todas as extremidades posteriores tenham igual comprimento. Depois disto, deixam-se as extremidades posteriores regenerar a parte da cabeça, num recipiente de cultura com o mesmo substrato utilizado na cultura de proveniência e com água reconstituída, até ao início da exposição. A regeneração da parte da cabeça é revelada quando os vermes sincronizados começam a enterrar-se no substrato (pode confirmar-se a presença de novas cabeças examinando uma subamostra representativa com um microscópio binocular). Considera-se que, desta fase em diante, os organismos sujeitos ao ensaio se encontram no mesmo estado fisiológico. Significa isto que, quando, durante o ensaio, os vermes sincronizados se regeneram por morfalaxia, é de esperar que a exposição de todos os animais aos sedimentos enriquecidos seja praticamente igual. Os vermes devem começar a ser alimentados quando começarem a enterrar-se no substrato, ou sete dias após a dissecação. O regime alimentar deve ser comparável ao das culturas normais, mas pode ser aconselhável fornecer aos vermes sincronizados a mesma fonte de alimento utilizada no ensaio. Conservam-se os vermes à temperatura de ensaio (20 °C ± 2 °C). Depois da regeneração da parte da cabeça, utilizam-se no ensaio vermes completos intactos de tamanho semelhante, que nadem ou rastejem ativamente após ligeiro estímulo mecânico. Há que evitar lesionar os vermes ou de lhes provocar reações de autotomia, manipulando-os para isso com pipetas de extremidade embotada a quente ou com pinças de aço inoxidável.

Quando se utilizam *Lumbriculus variegatus* no ensaio, devido ao modo particular de reprodução desta espécie, o número de vermes deve aumentar durante o ensaio, se as condições forem adequadas (6). Caso não haja reprodução durante um ensaio de bioacumulação com *Lumbriculus variegatus*, regista-se esse facto, que deve ser tido em conta na interpretação dos resultados do ensaio.

***Branchiura sowerbyi* (BEDDARD), Tubificidae, Oligochaeta (não validado em estudo interlaboratorial comparativo)**

A espécie *Branchiura sowerbyi* vive em diversos tipos de sedimentos de albufeiras, lagos, lagoas e rios, originalmente nas regiões tropicais, mas também pode ser encontrada em águas tépidas do hemisfério norte. No entanto, a espécie é

▼M6

mais abundante em sedimentos constituídos por lamas argilosas com teor elevado de matéria orgânica. Estes vermes vivem na camada de sedimentos, pois mesmo a parte posterior dos mesmos está normalmente enterrada. Esta espécie é facilmente identificável pelos filamentos branquiais existentes na parte posterior do corpo. Os adultos podem atingir 9 cm a 11 cm de comprimento e 40 mg a 50 mg de peso húmido. A taxa de reprodução é elevada; nas condições de temperatura e de alimentação adiante descritas, a população duplica em menos de duas semanas [Aston *et al.*, 1982, (65)]. A *Branchiura sowerbyi* tem vindo a ser utilizada em estudos de toxicidade e de bioacumulação [Marchese, Brinkhurst 1996 (31) e Roghair *et al.* 1996 (67), respetivamente].

Métodos de cultura

Apresenta-se a seguir uma descrição resumida das condições de cultura da *Branchiura sowerbyi*, fornecida por Mercedes R. Marchese, INALI, Argentina, e Carla J. Roghair, RIVM, Países Baixos.

Não está estabelecida uma técnica única para a cultura dos organismos a utilizar nos ensaios, podendo os mesmos ser cultivados em sedimentos naturais não-contaminados (31). A experiência prática revelou que um meio constituído por areia e sedimentos naturais melhora o estado dos vermes, comparativamente aos sedimentos naturais puros (32)(67). Podem utilizar-se para a cultura copos de 3 litros com 1 500 ml de meio constituído por sedimentos e água: 375 ml de sedimentos naturais não-contaminados (cerca de 10 % de carbono orgânico total, cerca de 17 % das partículas ≤ 63 μm), 375 ml de areia limpa (M32) e 750 ml de água reconstituída ou de água da torneira desclorada (31)(32)(67). Como substrato de cultura, também podem ser utilizados toalhetes de papel, mas, nesse caso, o crescimento populacional é inferior ao registado em sedimentos naturais. Em sistemas semiestáticos, areja-se lentamente a camada de água dos copos e renova-se semanalmente a água sobrenadante.

Começa-se com 25 vermes jovens em cada copo. Transcorridos dois meses, retiram-se os vermes crescidos dos sedimentos com uma pinça e transferem-se para um novo copo, no qual se introduziu meio de sedimentos e água preparado de fresco. O copo inicial também contém casulos e vermes jovens. É possível recolher até 400 vermes jovens em cada copo. Os vermes adultos podem ser utilizados como reprodutores durante, pelo menos, um ano.

As culturas devem ser mantidas a uma temperatura compreendida entre 21 °C e 25 °C. A variação de temperatura deve ser inferior a ± 2 °C. A 25 °C, o tempo necessário para o desenvolvimento embrionário, desde a postura do ovo até à saída do juvenil do casulo, é de aproximadamente três semanas. Em lama a 25 °C, verificou-se que a produção de ovos por verme de *Branchiura sowerbyi* sobrevivente oscila entre 6,36 (31) e 11,2 (30). O número de ovos por casulo oscila entre «1,8 a 2,8» (66)(69) e «até 8» (68).

É necessário medir semanalmente o oxigénio dissolvido, a dureza da água, a temperatura e o pH. Pode fornecer-se *ad libitum* um alimento para peixes (por exemplo TetraMin®), sob a forma de suspensão, duas ou três vezes por semana. Os vermes também podem ser alimentados com alface descongelada, *ad libitum*.

Uma vantagem importante desta espécie é a biomassa elevada por indivíduo (até 40 mg a 50 mg de peso húmido por espécime). Pode, portanto, utilizar-se esta espécie em ensaios de bioacumulação de substâncias sem marcação radioativa. A exposição pode realizar-se nos sistemas utilizados para a *Tubifex tubifex* ou a *Lumbriculus variegatus*, mas com apenas um espécime por replicado (11). A menos que se utilizem câmaras de ensaio maiores, deve, portanto, aumentar-se o número de replicados (11). É igualmente necessário adaptar a esta espécie o critério de validade relativo ao comportamento de enterramento.

▼**M6**

REFERÊNCIAS

1) ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. *In* ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

2) Comissão Europeia (2003). Technical Guidance Document on Risk Assessment in support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new notified substances, Commission Regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for existing substances and Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market — partes I a IV. Serviço das Publicações Oficiais das Comunidades Europeias, Luxemburgo.

3) OCDE (1992a). Report of the OECD workshop on effects assessment of chemicals in sediment. Monografia n.º 60 da OCDE. Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Económicos (OCDE), Paris.

4) Ingersoll, C.G., Ankley, G.T., Benoit D.A., Brunson, E.L., Burton, G.A., Dwyer, F.J., Hoke, R.A., Landrum, P.F., Norberg-King, T.J., Winger, P.V. (1995). Toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants using freshwater invertebrates: A review of methods and applications. *Environ. Toxicol. Chem.*, 14, 1885-1894.

5) Capítulo C.13 deste anexo: Bioconcentração: ensaio dinâmico com peixes.

6) US EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. 2.ª edição. EPA 600/R-99/064. U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, março de 2000.

7) Capítulo C.27 deste anexo: Ensaio de toxicidade em quironomídeos num sistema sedimentos-água com sedimentos enriquecidos.

8) Egeler, Ph., Römbke, J., Meller, M., Knacker, Th., Franke, C., Studinger, G., Nagel, R. (1997). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by tubificid sludgeworms (Oligochaeta) under standardised laboratory conditions. *Chemosphere*, 35, 835-852.

9) Ingersoll, C.G., Brunson, E.L., Wang N., Dwyer, F.J., Ankley, G.T., Mount D.R., Huckins J., Petty. J., Landrum, P.F. (2003). Uptake and depuration of nonionic organic contaminants from sediment by the oligochaete *Lumbriculus variegatus*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22, 872-885.

10) Phipps, G.L., Ankley, G.T., Benoit, D.A., Mattson, V.R. (1993). Use of the aquatic Oligochaete *Lumbriculus variegatus* for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. *Environ. Toxicol. Chem.*, 12, 269-279.

11) Egeler, Ph., Römbke, J., Knacker, Th., Franke, C., Studinger, G. (1999). Workshop on «Bioaccumulation: Sediment test using benthic oligochaetes» — 26-27.4.1999, Hochheim am Main, Alemanha. Report on the R+D-project No. 298 67 419, Umweltbundesamt, Berlim.

12) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J., Gilberg, D. (2006). Validation of a sediment bioaccumulation test with endobenthic aquatic oligochaetes by an international ring test. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Dessau), R&D No.: 202 67 437.

13) Kelly, J.R., Levine, S.N., Buttel, L.A., Kelly, A.C., Rudnick, D.T., Morton, R.D. (1990). Effects of tributyltin within a Thalassia seagrass ecosystem. *Estuaries*, 13, 301-310.

▼**M6**

14) Nendza, M. (1991). QSARs of bioaccumulation: Validity assessment of log K_{ow}/log BCF correlations. *In*: Nagel, R., Loskill, R. (editores): Bioaccumulation in aquatic systems. Contributions to the assessment. Proceedings of an international workshop, Berlim, 1990. VCH, Weinheim.

15) Landrum, P.F., Lee II, H., Lydy, M.J. (1992). Toxicokinetics in aquatic systems: Model comparisons and use in hazard assessment. *Environ. Toxicol. Chem.*, 11, 1709-1725.

16) Markwell, R.D., Connell, D.W., Gabric, A.J. (1989). Bioaccumulation of lipophilic compounds from sediments by oligochaetes. *Wat. Res.*, 23, 1443-1450.

17) Gabric, A.J., Connell, D.W., Bell, P.R.F. (1990). A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes. *Wat. Res.*, 24, 1225-1231.

18) Kukkonen, J., Landrum, P.F. (1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to *Lumbriculus variegatus* (Oligochaeta). *Environ. Toxicol. Chem.*, 13, 1457-1468.

19) Franke, C., Studinger, G., Berger, G., Böhling, S., Bruckmann, U., Cohors-Fresenborg, D., Jöhncke, U. (1994). The assessment of bioaccumulation. *Chemosphere*, 29, 1501-1514.

20) OCDE (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, No. 23.

21) US EPA (1996). Special Considerations for Conducting Aquatic Laboratory Studies. Ecological Effects Test Guidelines. OPPTS 850.1000. Public Draft. EPA 712-C-96-113. Agência de Protecção do Ambiente dos E.U.A.

22) Os seguintes capítulos deste anexo:

Capítulo A.4: Pressão de vapor;

Capítulo A.5: Tensão superficial;

Capítulo A.6: Solubilidade em água;

Capítulo A.8: Coeficiente de partição: método do «frasco agitado»;

Capítulo A.24: Coeficiente de partição: método por HPLC;

Capítulo C.7: Degradação — Degradação abiótica: hidrólise em função do pH;

Capítulo C.4: Determinação da biodegradabilidade «fácil», métodos A a F;

Capítulo C.19: Estimativa do valor do coeficiente de adsorção (K_{OC}) em solos e em lamas de depuração por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC);

Capítulo C.29: Biodegradabilidade «fácil» — CO_2 em recipientes fechados.

23) OCDE (1996). Direct phototransformation of chemicals in water. Environmental Health and Safety Guidance Document Series on Testing and Assessment of Chemicals, No. 3. OCDE, Paris.

24) Antoine, M.D., Dewanathan, S., Patonay, G. (1991). Determination of critical micelles concentration of surfactants using a near-infrared hydrophobicity probe. *Microchem. J.*, 43, 165-172.

▼**M6**

25) Beek, B., Boehling, S., Bruckmann, U., Franke, C., Joehncke, U., Studinger, G. (2000). The assessment of bioaccumulation. *In* Hutzinger, O. (editor), The Handbook of Environmental Chemistry, volume 2, parte J (editor do volume: B. Beek): Bioaccumulation — New Aspects and Developments. Springer-Verlag, Berlim, Heidelberg, 235-276.

26) Spacie, A., Hamelink, J.L. (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. *Environ. Toxicol. Chem.*, 1, 309-320.

27) Hawker, D.W., Connell, D.W. (1988). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. *Wat. Res.*, 22, 701-707.

28) Brunson, E.L., Canfield, T.J., Ingersoll, C.J., Kemble, N.E. (1998). Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the Upper Mississippi river using field-collected oligochaetes and laboratory-exposed *Lumbriculus variegatus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 35, 191-201.

29) Reynoldson, T.B., Thompson, S.P., Bamsey, J.L. (1991). A sediment bioassay using the tubificid oligochaete worm *Tubifex tubifex*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 10, 1061-1072.

30) Aston, R.J., Milner, A.G.P. (1981). Conditions for the culture of *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta: Tubificidae) in activated sludge. *Aquaculture*, 26, 155-160.

31) Marchese, M.R., Brinkhurst, R.O. (1996). A comparison of two tubificid species as candidates for sublethal bioassay tests relevant to subtropical and tropical regions. *Hydrobiologia*, 334, 163-168.

32) Roghair, C.J., Buijze, A. (1994). Development of sediment toxicity tests. IV. A bioassay to determine the toxicity of field sediments to the oligochaete worm *Branchiura sowerbyi*. RIVM Report 719102027.

33) Capítulo C.1 deste anexo: Toxicidade aguda para os peixes.

34) OCDE (1992c). Guidelines for Testing of Chemicals, No. 210. Fish, Early-life Stage Toxicity Test. OCDE, Paris.

35) Kaster, J.L., Klump, J.V., Meyer, J., Krezoski, J., Smith, M.E. (1984). Comparison of defecation rates of *Limnodrilus hoffmeisteri* using two different methods. *Hydrobiologia*, 11, 181-184.

36) Leppänen, M.T., Kukkonen, J.V.K. (1998). Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete *Lumbriculus variegatus* (Müller). *Hydrobiologia*, 377: 183-194.

37) Leppänen, M.T., Kukkonen, J.V.K. (1998). Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of *Lumbriculus variegatus* (Müller): Implications for sediment toxicity testing. *Environ. Toxicol. Chem.*, 17: 2196-2202.

38) Leppänen M.T., Kukkonen, J.V.K. (1998). Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (*Lumbriculus variegatus*, Müller). *Environ. Sci. Toxicol.*, 32, 1503-1508.

39) Martinez-Madrid, M., Rodriguez, P., Perez-Iglesias, J.I., Navarro, E. (1999). Sediment toxicity bioassays for assessment of contaminated sites in the Nervion river (Northern Spain). 2. *Tubifex tubifex* (Müller) reproduction sediment bioassay. *Ecotoxicology*, 8, 111-124.

▼**M6**

40) Capítulo C.8 deste anexo: Toxicidade em relação às minhocas.

41) Environment Canada (1995). Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. Environmental Protection Series Report EPS 1/RM/30.

42) Landrum, P.F. (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi*. *Environ. Sci. Toxicol.*, 23, 588-595.

43) Poddubnaya, T.L. (1980). Life cycles of mass species of Tubificidae (Oligochaeta). *In* Brinkhurst, R.O., Cook, D.G. (editores), *Aquatic Oligochaeta Biology*, 175-184. Plenum Press, Nova Iorque.

44) ASTM (1998). Standard guide for collection, storage, characterisation, and manipulation of sediment for toxicological testing. American Society for Testing and Materials, E 1391-94.

45) Hooftman, R.N., van de Guchte, K., Roghair, C.J. (1993). Development of ecotoxicological test systems to assess contaminated sediments. Joint report no. 1: Acute and (sub)chronic tests with the model compound chlorpyrifos. RIVM-719102022.

46) Franke, C. (1996). How meaningful is the bioconcentration factor for risk assessment? *Chemosphere*, 32, 1897-1905.

47) Mount, D.R., Dawson, T.D., Burkhard, L.P. (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus variegatus*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 18, 1244-1249.

48) Randall, R.C., Lee II, H., Ozretich, R.J., Lake, J.L., Pruell, R.J. (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. *Environ. Toxicol. Chem.*, 10, 1431-1436.

49) Gardner, W.S., Frez, W.A., Cichocki, E.A., Parrish, C.C. (1985). Micromethods for lipids in aquatic invertebrates. *Limnology and Oceanography*, 30, 1099-1105.

50) Bligh, E.G., Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37, 911-917.

51) De Boer, J., Smedes, F., Wells, D., Allan, A. (1999). Report on the QUASH interlaboratory study on the determination of total-lipid in fish and shellfish. Round 1 SBT-2. Exercise 1000. EU Standards, Measurement and Testing Programme.

52) Kristensen, P. (1991). Bioconcentration in fish: comparison of bioconcentration factors derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Water Quality Institute, Dinamarca.

53) Zok, S., Görge, G., Kalsch, W., Nagel, R. (1991). Bioconcentration, metabolism and toxicity of substituted anilines in the zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Sci. Total Environment*, 109/110, 411-421.

54) Nagel, R. (1988). Umweltchemikalien und Fische — Beiträge zu einer Bewertung. Habilitationsschrift, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Alemanha.

55) Janssen, M.P.M., Bruins, A., De Vries, T.H., Van Straalen, N.M. (1991). Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 20:305-312.

56) Van Brummelen, T.C., Van Straalen, N.M. (1996). Uptake and elimination of benzo(a)pyrene in the terrestrial isopod *Porcellio scaber*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 31:277-285.

▼**M6**

57) Sterenborg, I., Vork, N.A., Verkade, S.K., Van Gestel, C.A.M., Van Straalen, N.M. (2003). Dietary zinc reduces uptake but not metallothionein binding and elimination of cadmium in the springtail *Orchesella cincta*. *Environ. Toxicol. Chemistry*, 22:1167-1171.

58) Suedel, B.C., Rodgers, J.H. (1993). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. *Environ. Toxicol. Chem.*, 13, 1163-1175.

59) Wachs, B. (1967). Die Oligochaeten-Fauna der Fließgewässer unter besonderer Berücksichtigung der Beziehung zwischen der Tubificiden-Besiedlung und dem Substrat. *Arch. Hydr.*, 63, 310-386.

60) Oliver, B.G. (1987). Biouptake of chlorinated hydrocarbons from laboratory-spiked and field sediments by oligochaete worms. *Environ. Sci. Technol.*, 21, 785-790.

61) Chapman, P.M., Farrell, M.A., Brinkhurst, R.O. (1982a). Relative tolerances of selected aquatic oligochaetes to individual pollutants and environmental factors. *Aquatic Toxicology*, 2, 47-67.

62) Chapman, P.M., Farrell, M.A., Brinkhurst, R.O. (1982b). Relative tolerances of selected aquatic oligochaetes to combinations of pollutants and environmental factors. *Aquatic Toxicology*, 2, 69-78.

63) Rodriguez, P., Reynoldson, T.B. (1999). Laboratory methods and criteria for sediment bioassessment. *In* Mudroch, A., Azcue, J.M., Mudroch, P. (editores), Manual of Bioassessment of aquatic sediment quality. Lewis Publishers, Boca Raton, CRC Press LLC.

64) Brinkhurst, R.O. (1971). A guide for the identification of British aquatic oligochaeta. *Freshw. Biol. Assoc.*, Sci. Publ. No. 22.

65) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J., Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. Em colaboração com Nagel, R., e Karaoglan, B. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No. 202 67 429.

66) Aston, R.J., Sadler, K., Milner, A.G.P. (1982). The effect of temperature on the culture of *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta: Tubificidae) on activated sludge. *Aquaculture*, 29, 137-145.

67) Roghair, C.J., Buijze, A., Huys, M.P.A., Wolters-Balk, M.A.H., Yedema, E.S.E., Hermens, J.L.M. (1996). Toxicity and toxicokinetics for benthic organisms; II: QSAR for base-line toxicity to the midge *Chironomus riparius* and the tubificid oligochaete worm *Branchiura sowerbyi*. RIVM Report 719101026.

68) Aston, R.J. (1984). The culture of *Branchiura sowerbyi* (Tubificidae, Oligochaeta) using cellulose substrate. *Aquaculture*, 40, 89-94.

69) Bonacina, C., Pasteris, A., Bonomi, G., Marzuoli, D. (1994). Quantitative observations on the population ecology of *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta, Tubificidae). *Hydrobiologia*, 278, 267-274.

▼M7

C.47. ENSAIO DE TOXICIDADE NOS PRIMEIROS ESTÁDIOS DE VIDA EM PEIXES

INTRODUÇÃO

1. Este método de ensaio é equivalente ao *Test Guideline* 210 (2013) da OCDE. Os ensaios realizados em peixes nos primeiros estádios de vida destinam-se a determinar os efeitos letais e subletais de produtos químicos nas espécies estudadas, nas fases vitais correspondentes. Estes ensaios permitem obter informações preciosas para a previsão de efeitos letais e subletais do produto químico em causa noutras espécies de peixes.

2. O *Test Guideline* 210 baseia-se numa proposta apresentada pelo Reino Unido, examinada numa reunião de peritos da OCDE que teve lugar em Medmenham, no Reino Unido, em novembro de 1988 e posteriormente atualizada (em 2013), para espelhar a experiência adquirida na utilização deste ensaio e as recomendações formuladas numa sessão sobre ensaios de toxicidade em peixes, que a OCDE organizou em setembro de 2010 (1).

PRINCÍPIO DO ENSAIO

3. Expõem-se peixes nos primeiros estádios de vida a uma gama de concentrações do produto químico em estudo dissolvido em água. São preferíveis condições de fluxo contínuo, mas, se não forem possíveis, admitem-se condições semiestáticas. Para mais informações, pode consultar-se o documento de orientações da OCDE sobre ensaios de toxicidade em meio aquático de substâncias e misturas difíceis (2). O ensaio começa com a colocação de ovos fertilizados em cubas de ensaio e decorre durante o período, adaptado à espécie em estudo, necessário para os peixes de controlo atingirem o estádio juvenil. Avaliam-se os efeitos letais e subletais e comparam-se com os valores correspondentes ao grupo de controlo, a fim de determinar a LOEC (menor concentração com efeitos observáveis) e, em seguida, a NOEC (concentração sem efeitos observáveis) e/ou a CE_x (por exemplo: CE_{10} ou CE_{20}), recorrendo a um modelo de regressão para estimar a concentração causadora de uma variação de x % no efeito medido. Os parâmetros e concentrações associados a efeitos a mencionar nos relatórios podem ser condicionados pelo quadro regulamentar aplicável. As concentrações ensaiadas devem abranger a CEx, para que esta seja determinada por interpolação e não por extrapolação (ver definições no apêndice 1).

INFORMAÇÕES SOBRE O PRODUTO QUÍMICO EM ESTUDO

4. Entende-se por «produto químico em estudo» aquilo que é ensaiado. É necessário conhecer a hidrossolubilidade (capítulo A.6 deste anexo) e a pressão de vapor (capítulo A.4 deste anexo) do produto químico em estudo, devendo dispor-se de um método analítico fiável para a determinação quantitativa do produto químico nas soluções de ensaio, cujos limite de quantificação e exatidão sejam conhecidos e estejam descritos. Embora não necessário, um ensaio de toxicidade aguda (ver os capítulos C.1 ou C.49 deste anexo) pode fornecer informações úteis (a ser realizado, sê-lo-á de preferência nas espécies escolhidas para este ensaio).

5. Se se utilizar este método de ensaio para estudar uma mistura, é necessário caracterizar o mais possível a composição desta, nomeadamente a identidade química, a ocorrência quantitativa e as propriedades enquanto substância (como as acima referidas) dos seus componentes. Antes de o utilizar para ensaios normativos de uma mistura, deve ponderar-se se o método gerará resultados aceitáveis para os fins normativos pretendidos.

6. A fórmula estrutural, o grau de pureza da substância, a hidrossolubilidade, a estabilidade em água e à luz, o pK_a, o P_{ow} e os resultados de um ensaio de biodegradabilidade «fácil» (segundo os capítulos C.4 e C.29 deste anexo, por exemplo) constituem informações úteis.

▼M7

VALIDADE DO ENSAIO

7. Para que um ensaio possa considerar-se válido, têm de ser cumpridas as seguintes condições:

— concentração de oxigénio dissolvido, ao longo de todo o ensaio, superior a 60 % do valor da saturação com ar;

— diferença de temperatura da água entre as diversas cubas de ensaio ou entre dias consecutivos não superior a ± 1,5 °C em qualquer momento do ensaio, mantendo-se ainda a temperatura da água na gama de temperaturas especificada para a espécie utilizada (apêndice 2);

— determinação analítica das concentrações experimentais;

— taxa global de sobrevivência dos ovos fertilizados e após a eclosão, do grupo de controlo e, quando aplicável, do grupo de controlo do solvente, igual ou superior aos limites definidos no apêndice 2.

8. Caso se observe um pequeno desvio dos critérios de validade, analisam-se as consequências na fiabilidade dos dados do ensaio e inclui-se essa análise no relatório. Os efeitos na sobrevivência, na eclosão ou no crescimento verificados no grupo de controlo do solvente, comparativamente ao grupo de controlo negativo, devem ser discutidos numa perspetiva de fiabilidade dos dados do ensaio e incluídos no relatório.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Cubas de ensaio

9. Podem utilizar-se quaisquer cubas de vidro, de aço inoxidável ou de outro material quimicamente inerte. Dada a forte capacidade que o silicone reconhecidamente tem de absorver substâncias lipofílicas, deve reduzir-se ao mínimo a utilização de tubagens de silicone nos estudos de fluxo contínuo e a utilização de vedações de silicone em contacto com água, recorrendo para o efeito, por exemplo, a aquários de vidro em monobloco. As dimensões das cubas devem ser suficientes para permitir um crescimento adequado nas cubas de controlo, para que a concentração de oxigénio dissolvido se mantenha (o que, por exemplo, no caso de espécies de peixes pequenas, se consegue com cubas de 7 l) e para que os critérios de taxa de carga referidos no ponto 19 sejam respeitados. É desejável que as cubas de ensaio sejam posicionadas de forma aleatória na área de ensaio. Porém, em vez de uma disposição completamente aleatória, é preferível uma organização por blocos e uma disposição aleatória em cada bloco, estando todas as concentração de exposição presentes em cada bloco. As cubas de ensaio devem estar protegidas contra perturbações indesejadas. É preferível que, antes da introdução dos organismos, o sistema de ensaio seja exposto às concentrações previstas do produto químico em estudo durante um período suficiente para comprovar a estabilidade dessas concentrações.

Escolha das espécies

10. O quadro 1 refere as espécies de peixes recomendadas. Podem ser utilizadas outras, mas o protocolo de ensaio poderá ter de ser adaptado de modo a proporcionar condições de ensaio adequadas. Nesse caso, será necessário fundamentar a escolha da espécie e descrever o método experimental.

Manutenção dos peixes reprodutores

11. O apêndice 3 e as referências (3) (4) e (5) contêm elementos sobre a manutenção dos reprodutores em condições satisfatórias.

Manipulação de ovos fertilizados, embriões e larvas

12. Inicialmente, os ovos fertilizados, os embriões e as larvas podem ser expostos em cubas de vidro ou de aço inoxidável mais pequenas, dispostas no

▼M7

interior da cuba principal e cujos lados ou extremidades sejam constituídos por uma rede que possibilite o fluxo da solução em estudo através de cada cuba. Uma forma de criar um fluxo não-turbulento através dessas cubas mais pequenas consiste em pendurá-las num braço que as movimente para cima e para baixo, mas mantenha os organismos sempre submersos. Os ovos fertilizados de salmonídeos podem ser colocados em suportes ou redes com orifícios suficientemente largos para permitir que as larvas saiam após a eclosão.

13. Quando se utilizam recipientes, grelhas ou malhas para confinar os ovos na cuba de ensaio principal, esses dispositivos devem ser removidos após a eclosão das larvas, seguindo as orientações do apêndice 3, com exceção das malhas necessárias para evitar que as larvas escapem. Se for necessário transferi-las, as larvas não devem ser expostas ao ar. Também não devem ser utilizadas redes para retirar larvas de recipientes de ovos. O momento adequado para efetuar a transferência varia de espécie para espécie e deve ser referido no relatório. Todavia, esta transferência nem sempre é necessária.

Água

14. Pode utilizar-se nos ensaios qualquer água na qual a espécie em estudo apresente taxas adequadas de crescimento e de sobrevivência a longo prazo (ver o apêndice 4). A qualidade da água deve manter-se constante durante o ensaio. Para assegurar que a água de diluição não influencia indevidamente o resultado do ensaio (por exemplo por complexação do produto químico em estudo) nem afeta negativamente o desempenho dos progenitores, devem ser colhidas regularmente amostras para análise. Deve determinar-se o teor de metais pesados (Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni etc.), dos principais aniões e catiões (Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, SO_4^{2-} etc.), de amoníaco, de pesticidas clorados residuais totais, de carbono orgânico total e de sólidos em suspensão. Caso se saiba que a qualidade da água de diluição se mantém relativamente constante, estas medições podem realizar-se, por exemplo, duas vezes por ano. Caso se saiba que a qualidade da água varia, as medições têm de ser mais frequentes, dependendo a frequência do grau dessa variabilidade. No apêndice 4 apresentam-se algumas características químicas de uma água de diluição aceitável.

Soluções utilizadas no ensaio

15. Nos ensaios de fluxo contínuo, tendo em vista a manutenção da série pretendida de concentrações nas cubas utilizadas no ensaio, é necessário um sistema que forneça e dilua continuamente uma solução de reserva do produto químico em estudo (por exemplo: por meio de uma bomba doseadora, de um diluidor proporcional ou de um sistema saturador). Os caudais das soluções de reserva e da água de diluição devem ser verificados regularmente durante o ensaio e não devem variar mais de 10 % ao longo do ensaio. Considera-se adequado um caudal equivalente a, pelo menos, o volume de cinco cubas de ensaio em 24 horas (3). Todavia, se a taxa de carga especificada no ponto 19 for respeitada, admite-se um caudal inferior (por exemplo: o volume de duas a três cubas em 24 horas), para evitar o rápido arrastamento da comida.

16. Preparam-se as soluções a utilizar nos ensaios por diluição de uma solução de reserva até à concentração escolhida. Preferencialmente, prepara-se a solução de reserva por simples mistura ou agitação do produto químico na água de diluição, utilizando meios mecânicos (agitação e/ou dispersão ultrassónica, por exemplo). Podem ser utilizados colunas de saturação (colunas de solubilidade) ou métodos de dosagem passivos (6) para obter soluções de reserva de concentração adequada. Não se recomenda a utilização de solventes, mas, se for necessário um solvente, há que ensaiá-lo em paralelo, com a mesma concentração de solvente que nas cubas de exposição ao produto químico em estudo; de preferência, a concentração do solvente deve ser a mesma em todas as cubas de exposição e nas cubas de controlo do solvente. No caso de alguns sistemas de diluição, isto pode ser tecnicamente difícil. Em tal caso, a concentração de solvente nas cubas de controlo do solvente deve ser igual à maior concentração de solvente nas cubas de exposição. No caso das substâncias difíceis de ensaiar, deve consultar-se o documento de orientações da OCDE n.º 23, relativo a ensaios de toxicidade

▼M7

em meio aquático de substâncias e misturas difíceis (2). A escolha do solvente eventualmente utilizado depende das propriedades químicas da substância em causa. O documento de orientações da OCDE n.º 23 recomenda que não se ultrapasse a concentração de 100 µl/l. Para evitar eventuais efeitos do solvente nos parâmetros medidos (7), recomenda-se que a concentração do solvente seja a menor possível.

17. No ensaio em condições semiestáticas, podem ser adotados dois métodos de renovação diferentes: ou se preparam novas soluções de ensaio em cubas limpas e se transferem cautelosamente os ovos e larvas sobreviventes para as novas cubas; ou se mantêm os organismos em estudo nas cubas de ensaio e se renova diariamente uma parte (pelo menos dois terços) do volume da solução em estudo ou da solução de controlo.

PROTOCOLO DE ENSAIO

Condições de exposição

Duração

18. Inicia-se o ensaio o mais rapidamente possível após a fertilização dos ovos, sendo preferível imergi-los nas soluções em estudo antes de iniciada a segmentação do blastodisco ou o mínimo de tempo possível após esse estádio. A duração do ensaio dependerá da espécie utilizada. Recomendam-se algumas durações no apêndice 2.

Carga

19. O número de ovos fertilizados no início do ensaio deve ser suficiente para cumprir os requisitos estatísticos. Os ovos devem ser distribuídos aleatoriamente pelos grupos de exposição; o número mínimo de ovos por nível de concentração é de 80, igualmente divididos por, pelo menos, quatro cubas de ensaio replicadas. A taxa de carga (biomassa por volume de solução de ensaio) deve ser suficientemente baixa para que a concentração de oxigénio dissolvido se mantenha a, pelo menos, 60 % do valor de saturação com ar, sem necessidade de arejamento, durante os estádios embrionário e larvar. Para os ensaios de fluxo contínuo, recomenda-se uma taxa de carga não superior a 0,5 g/l (peso húmido) em 24 horas e sempre não superior a 5 g/l de solução (3).

Luz e temperatura

20. O fotoperíodo e a temperatura da água devem ser adequados à espécie utilizada no ensaio (ver o apêndice 2).

Alimentação

21. O regime alimentar dos peixes é um aspeto da maior importância, sendo essencial fornecer o alimento adequado a cada estádio vital, a partir do momento certo, em quantidade suficiente para um crescimento normal. A alimentação deve ser aproximadamente a mesma nos vários replicados, a menos que seja adaptada em função da mortalidade. Para evitar a acumulação de resíduos, removem-se o excesso de alimento e as fezes sempre que necessário. O apêndice 3 descreve determinados regimes alimentares, mas o objetivo prosseguido é o aperfeiçoamento contínuo dos regimes alimentares em função da experiência adquirida, de modo a melhorar a taxa de sobrevivência e otimizar o crescimento. Os alimentos vivos enriquecem o ambiente; por conseguinte, devem ser utilizados em vez de alimentos secos ou congelados, ou em complemento destes, sempre que isso se adeque à espécie e ao estádio vital em causa.

Concentrações ensaiadas

22. Normalmente, utilizam-se cinco concentrações do produto químico em estudo, intervaladas por um fator constante não superior a 3,2, com um mínimo de quatro replicados por nível de concentração. Para se escolher a gama de concentrações a ensaiar, devem ser tidas em conta as informações eventualmente disponíveis provenientes de ensaios de toxicidade aguda, de preferência na mesma espécie, ou pode realizar-se um ensaio exploratório daquela gama (1). Todavia, no processo de escolha da gama de concentrações a ensaiar, devem ser tidas em conta todas as fontes de informação, designadamente as provenientes de métodos comparativos por interpolação ou dados

▼M7

de ensaios de toxicidade aguda em embriões de peixes. Caso se pretenda definir apenas NOEC empíricas, pode ser aceitável, como ensaio definitivo, um ensaio do limite, ou um ensaio do limite alargado, de menos de cinco concentrações. A utilização de menos de cinco concentrações carece de justificação. Não é necessário ensaiar concentrações do produto químico em estudo que excedam a CL_{50} às 96 horas ou 10 mg/l, prevalecendo como critério o valor mais baixo.

Controlos

23. Além do ensaio da série de concentrações do produto químico em estudo (ponto 16), deve realizar-se um ensaio de controlo da água de diluição e, se necessário, um ensaio de controlo do solvente utilizado.

Frequência das medições e das determinações analíticas

24. Antes de iniciar o período de exposição, é necessário verificar se o sistema de distribuição do produto químico está a funcionar bem em todos os replicados (por exemplo medindo as concentrações a ensaiar). Os métodos analíticos necessários devem estar bem estabelecidos, incluindo um limite de quantificação adequado e um conhecimento suficiente da estabilidade da substância no sistema de ensaio. Durante o ensaio, determinam-se as concentrações do produto químico em estudo a intervalos regulares, para caracterizar a exposição. São necessárias, pelo menos, cinco determinações. No caso dos sistemas de fluxo contínuo, deve realizar-se, pelo menos uma vez por semana, uma determinação analítica do produto químico em estudo num replicado de cada nível de concentração, de cada vez num replicado diferente. A realização de mais determinações analíticas melhora, em geral, a qualidade dos resultados do ensaio. Para garantir que as determinações do produto químico se realizam na verdadeira solução do mesmo, pode ser necessário filtrar as amostras, para remover eventuais partículas (utilizando filtros com porosidade de 0,45 μm, por exemplo), ou centrifugá-las. Para reduzir a adsorção do produto químico em estudo, os filtros devem ser previamente saturados. Se as concentrações medidas se desviarem do intervalo de 80-120 % da concentração nominal, as concentrações associadas a efeitos devem ser determinadas e expressas do seguinte modo: no caso dos ensaios por fluxo contínuo, em relação à média aritmética das concentrações (ver o cálculo da média aritmética no apêndice 6 do método C.20 (8)); no caso dos ensaios semiestáticos, em relação à média geométrica das concentrações medidas (ver o capítulo 5 do documento de orientações da OCDE relativo a ensaios de toxicidade em meio aquático de substâncias e misturas difíceis (2)).

25. Durante o ensaio, medem-se, pelo menos semanalmente, o oxigénio dissolvido, o pH e a temperatura em cada cuba; se necessário, medem-se a salinidade e a dureza no início e no final do ensaio. De preferência, monitoriza-se a temperatura continuamente em, pelo menos, uma cuba de ensaio.

Exames

26. **Estádio embrionário**: O estádio embrionário no início da exposição ao produto químico em estudo deve ser verificado com o máximo de rigor possível. Pode utilizar-se para o efeito uma amostra representativa de ovos adequadamente limpos e conservados.

27. **Eclosão e sobrevivência**: O exame da eclosão e da sobrevivência deve ser, pelo menos, diário, registando-se os números apurados. Caso se observem fungos nos ovos no início do desenvolvimento embrionário (por exemplo no primeiro ou no segundo dias do ensaio), os ovos em causa devem ser contados e retirados. Removem-se os embriões, larvas e peixes juvenis mortos logo que se detetem, pois podem decompor-se rapidamente e ser despedaçados pelos outros peixes. A remoção dos indivíduos mortos deve ser extremamente cuidadosa, de modo a não danificar os ovos e larvas vizinhos. Os sinais de morte dependem da espécie e do estádio vital. Por exemplo:

▼M7

— ovos fertilizados: particularmente nos estádios iniciais, acentuada perda de translucidez e alteração da coloração, causadas por coagulação e/ou precipitação de proteínas e conduzindo a um aspeto branco opaco;

— embriões, larvas e peixes juvenis: imobilidade e/ou ausência de movimentos respiratórios e/ou ausência de batimentos cardíacos e/ou ausência de reação a estímulos mecânicos.

28. **Aspeto anómalo**: A intervalos adequados, em função da duração do ensaio e da natureza da anomalia, regista-se o número de larvas ou de peixes juvenis que apresentem anomalias de forma corporal. A ocorrência de larvas e peixes juvenis com anomalias é um fenómeno natural, podendo, nalgumas espécies, afetar alguns pontos percentuais dos efetivos do(s) grupo(s) de controlo. Caso se considere que as deformações e o comportamento anormal associado são tais que causam sofrimento considerável ao organismo, tendo este ultrapassado o ponto de reversibilidade, o organismo em causa pode ser retirado do ensaio. Os animais nessas condições devem ser eutanasiados, tratando-se como casos de mortalidade na subsequente análise de dados. O desenvolvimento embrionário normal da maior parte das espécies recomendadas neste método de ensaio está descrito na bibliografia (9) (10) (11) (12).

29. **Comportamento anómalo**: A intervalos adequados, consoante a duração do ensaio (por exemplo: uma vez por dia, no caso das espécies de água quente), registam-se todas as anomalias detetadas, como hiperventilação, natação descoordenada e alimentação ou inatividade atípicas. Estes efeitos, embora de difícil quantificação, podem, quando observados, ser úteis na interpretação dos dados de mortalidade.

30. **Peso**: No final do ensaio, pesam-se os peixes sobreviventes, pelo menos por replicado (registando-se o número de peixes presentes no replicado e o peso médio por peixe): é preferível o peso húmido (enxuto), mas também pode indicar-se no relatório o peso seco (13).

31. **Comprimento**: No termo do ensaio, mede-se cada peixe. Recomenda-se a medição do comprimento total; se, no entanto, a barbatana caudal apresentar sinais de decomposição ou de erosão, pode optar-se pelo comprimento normalizado. O método utilizado deve ser o mesmo para todos os peixes participantes no ensaio. Pode medir-se o comprimento de cada peixe com o auxílio de um paquímetro, de uma máquina fotográfica digital ou de um micrómetro ocular calibrado. Indicam-se no apêndice 2 os comprimentos mínimos habituais.

DADOS E RELATÓRIOS

Tratamento dos resultados

32. Se for necessário determinar a NOEC, recomenda-se que a capacidade do protocolo experimental e do teste estatístico escolhido para detetar alterações de importância biológica nos parâmetros se situe, pelo menos, ao nível de 80 %. Os parâmetros e concentrações associados a efeitos a mencionar nos relatórios podem ser condicionados pelo quadro regulamentar aplicável. Se for necessário determinar uma CE_x, o protocolo experimental e o modelo de regressão escolhido devem permitir que essa concentração seja estimada nas seguintes condições: i) o intervalo de confiança a 95 % da CE_x não compreende o valor zero e não é demasiado amplo; ii) o intervalo de confiança a 95 % da média prevista à concentração CE_x não compreende a média do grupo de controlo; iii) o modelo de regressão não está significativamente desajustado dos dados. Em ambos os casos, é necessário precisar a variação percentual de cada parâmetro que importa detetar ou estimar. O protocolo experimental deve possibilitá-lo. Se as condições enunciadas para a determinação da CE_x não forem satisfeitas, deve optar-se pela NOEC. É improvável que a mesma variação percentual ocorra em todos os parâmetros e que seja possível conceber uma experiência realizável que satisfaça os referidos critérios para todos os parâmetros. Por conseguinte, a experiência deve ser

▼M7

concebida de modo a concentrar-se adequadamente nos parâmetros que nela sejam importantes. Os apêndices 5 e 6 contêm orientações e fluxogramas estatísticos para ambos os casos, úteis para orientar o tratamento dos dados e a escolha do modelo ou teste estatístico mais adequado a utilizar. Admitem-se outras abordagens estatísticas, desde que cientificamente justificadas.

33. É necessário analisar as variações em cada série de replicados, efetuando uma análise de variância ou recorrendo a tabelas de contingência, e utilizar os métodos de análise estatística que aquela aconselhe. Para efeitos de comparações múltiplas entre os resultados obtidos para cada concentração e os resultados obtidos para o grupo de controlo, recomendam-se os testes regressivos de Jonckheere-Terpstra ou de Williams, no caso das respostas contínuas, e o teste regressivo de Cochran-Armitage, no caso das respostas quantais compatíveis com uma relação concentração-resposta monótona e sem indícios de variância extrabinomial (14). Se houver indícios de variância extrabinomial, recomendam-se a modificação de Rao-Scott do teste de Cochran-Armitage (15) (16) ou os testes de Williams ou de Dunnett (após transformação arcosseno da raiz quadrada) ou de Jonckheere-Terpstra, aplicados às proporções associadas a cada replicado. Se os dados não forem compatíveis com uma relação monótona concentração-resposta, os métodos de Dunnett, de Dunn ou de Mann-Whitney poderão ser úteis no caso das respostas contínuas e o teste exato de Fisher no caso das respostas quantais (14) (17) (18). Ao aplicar um método ou modelo estatístico, há que verificar se todos os requisitos do modelo ou método são satisfeitos (por exemplo, a variabilidade de cuba para cuba é estimada e tida em conta no protocolo experimental e no modelo ou teste estatístico utilizado). O grau de normalidade dos dados deve ser avaliado; o apêndice 5 indica o tratamento a dar aos resíduos de uma ANOVA. O apêndice 6 contém elementos adicionais relativos à regressão. Deve ponderar-se a necessidade de transformações para satisfazer os requisitos do teste estatístico. No entanto, as transformações com vista ao ajustamento de um modelo de regressão exigem grande cuidado, uma vez que, por exemplo, uma variação de 25 % na resposta não-transformada não corresponde a uma variação de 25 % na resposta transformada. Em todas as análises, é a cuba de ensaio, e não o peixe, que constitui a unidade de análise e a unidade experimental, facto que tanto os testes de hipóteses como as regressões têm de espelhar (3) (14) (19) (20).

Relatório do ensaio

34. Elementos a constar do relatório do ensaio:

Produto químico em estudo:

Substância monocomponente

— aspeto físico, hidrossolubilidade e outras propriedades físico-químicas relevantes;

— dados de identificação química, como denominações IUPAC ou CAS, número CAS, código SMILES ou código InChI, fórmula estrutural, grau de pureza, identidade química das impurezas, caso se justifique e seja exequível, etc. (incluindo teor de carbono orgânico, se for caso disso).

Substância multicomponentes, UVCB e misturas

— caracterização, tanto quanto possível, por exemplo: pela identidade química (ver acima), pela ocorrência quantitativa e pelas propriedades físico-químicas relevantes dos componentes.

Espécie utilizada no ensaio:

— nome científico, estirpe, origem e método de recolha e de manipulação dos ovos fertilizados.

▼M7

Condições de realização do ensaio:

— protocolo de ensaio utilizado (por exemplo: semiestático ou de fluxo contínuo, carga);

— fotoperíodo(s);

— planeamento do ensaio — por exemplo: número de cubas de ensaio e de replicados, número de ovos por replicado, material e dimensão das cubas de ensaio (altura, largura, volume), volume de água por cuba;

— método de preparação das soluções de reserva e frequência de renovação (indicar o agente de solubilização e a sua concentração, quando utilizado);

— método de dosagem do produto químico em estudo (por exemplo: bombas, sistemas de diluição);

— eficiência de recuperação do método e valores nominais das concentrações de ensaio, limite de quantificação, médias dos valores medidos e respetivos desvios-padrão nas cubas de ensaio e o método de obtenção desses desvios e médias, bem como elementos comprovativos de que as medições correspondem às concentrações do produto químico em estudo na verdadeira solução;

— características da água de diluição: pH, dureza, temperatura, concentração do oxigénio dissolvido, níveis de cloro residual (caso tenham sido medidos), carbono orgânico total (idem), sólidos em suspensão (idem), salinidade do meio de ensaio (idem) e quaisquer outras medições efetuadas;

— qualidade da água nas cubas de ensaio (pH, dureza, temperatura e concentração do oxigénio dissolvido);

— informações pormenorizadas sobre a alimentação (por exemplo: tipo de alimento(s), proveniência, quantidade fornecida e frequência).

Resultados individualizados (ou por replicado) e sob a forma de média e coeficiente de variação, consoante o caso, para os seguintes parâmetros:

— prova de que o grupo de controlo satisfez o critério de aceitação estabelecido para a sobrevivência global da espécie estudada (apêndice 2);

— dados de mortalidade referentes a cada estádio (embrionário, larvar e juvenil) e mortalidade acumulada;

— dias decorridos até à eclosão, número de ovos eclodidos por dia e final da eclosão;

— número de peixes saudáveis no final do ensaio;

— dados de comprimento (indicar se normalizado ou total) e de peso dos animais sobreviventes;

— incidência, descrição e número das anomalias morfológicas eventualmente observadas;

— incidência, descrição e número dos efeitos comportamentais eventualmente observados;

— abordagem seguida na análise estatística (análise de regressão ou análise da variância) e no tratamento dos dados (modelo ou teste estatístico utilizado);

— concentração sem efeitos observáveis (NOEC) correspondente a cada resposta avaliada;

▼M7

— menor concentração com efeitos observáveis (a p=0,05) (LOEC) correspondente a cada resposta avaliada;

— CE_x correspondente a cada resposta avaliada, se for o caso, e intervalos de confiança (90 % ou 95 %, por exemplo), gráfico do modelo ajustado utilizado para a calcular, declive da curva concentração-resposta, fórmula do modelo de regressão, estimativa dos parâmetros do modelo e erros-padrão correspondentes.

Desvios ao método de ensaio.

Discussão dos resultados, incluindo qualquer influência de desvios ao método de ensaio nos resultado do ensaio.

Quadro 1

Espécies de peixes recomendadas para os ensaios.

DE ÁGUA DOCE	ESTUARINAS OU MARINHAS
Oncorhynchus mykiss Truta arco-íris	*Cyprinodon variegatus* Sargo-choupa
Pimephales promelas Vairão-de-cabeça-grande	*Menidia* sp. Peixe-rei
Danio rerio Peixe-zebra	
Oryzias latipes Peixe-do-arroz-japonês	

REFERÊNCIAS

1) OCDE (2012). Fish Toxicity Testing Framework. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, No. 171. OCDE, Paris.

2) OCDE (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, No. 23. OCDE, Paris.

3) ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes. American Society for Testing and Materials, E 1241-88, 26 pp.

4) Brauhn, J.L., Schoettger, R.A. (1975). Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel catfish and Bluegills. Ecological Research Series, EPA-660/3-75-011. Duluth, Minnesota.

5) Brungs, W.A., Jones, B.R. (1977). Temperature Criteria for Freshwater Fish: Protocol and Procedures. Ecological Research Series, EPA-600/3-77--061. Duluth, Minnesota.

6) Adolfsson-Erici *et al.* (2012). A flow-through passive dosing system for continuously supplying aqueous solutions of hydrophobic chemicals to bioconcentration and aquatic toxicity tests. *Chemosphere*, 86, 593-599.

7) Hutchinson, T.H., *et al.* (2006). Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. *Aquatic Toxicology*, 76, 69-92.

8) Capítulo C.20 deste anexo: Ensaio de reprodução com *Daphnia magna*.

9) Hansen, D.J., Parrish, P.R. (1977). Suitability of sheepshead minnows (*Cyprindon variegatus*) for life-cycle toxicity tests, *in* Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (editado por Mayer, F.L., Hamelink, J.L.), ASTM STP 634.

10) Kimmel, H.B., *et al.* (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*, 203:253–310.

▼**M7**

11) Gonzalez-Doncel, M., *et al.* (2005). A quick reference guide to the normal development of *Oryzias latipes* (Teleostei, Adrinichthydae). *Journal of Applied Ichthyology*, 20:1–14.

12) Devlin, E.W., *et al.* (1996). Prehatching Development of the Fathead Minnow, *Pimephales promelas* Rafinesque. EPA/600/R-96/079. USEPA, Office of Research and Development, Washington, D.C.

13) Oris, J.T., Belanger, S.C., Bailer, A.J. (2012). Baseline characteristics and statistical implications for the OECD 210 Fish Early Life Stage Chronic Toxicity Test. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31;2, 370–376.

14) OCDE (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, No. 54. OCDE, Paris.

15) Rao, J.N.K., Scott, A.J. (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. *Biometrics*, 48, 577-585.

16) Rao, J.N.K., Scott, A.J. (1999). A simple method for analyzing overdispersion in clustered Poisson data. *Statistics in Medicine*, 18, 1373-1385.

17) Dunnett, C.W. (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *Journal of American Statistical Association*, 50, 1096-1121.

18) Dunnett, C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics*, 20, 482-491.

19) Rand, G.M., Petrocelli, S.R. (1985). Fundamentals of Aquatic Toxicology. Hemisphere Publication Corporation, Nova Iorque.

20) McClave, J.T., Sullivan, J.H., Pearson, J.G. (1980). Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data. Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium. ASTM, Filadélfia.

▼M7

Apêndice 1

DEFINIÇÕES

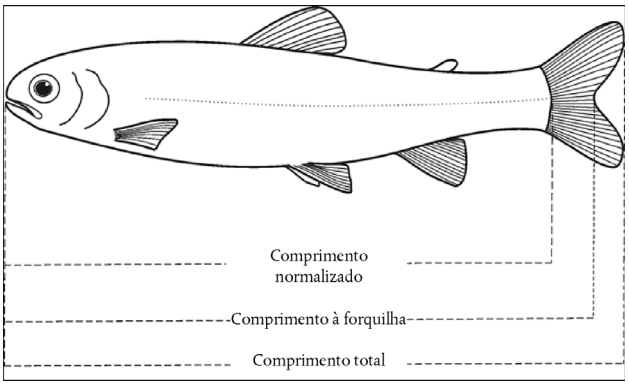
Comprimento à forquilha*:* comprimento entre a extremidade do focinho e a extremidade dos raios centrais da barbatana caudal; é utilizado nos peixes nos quais é difícil indicar onde termina a coluna vertebral (www.fishbase.org).

Comprimento normalizado*:* comprimento do peixe medido entre a extremidade do focinho e a extremidade posterior da última vértebra ou a extremidade posterior da parte lateral média da placa hipural. Ou seja, esta medida exclui o comprimento da barbatana caudal (www.fishbase.org).

Comprimento total*:* comprimento entre a extremidade do focinho e a extremidade do lobo mais longo da barbatana caudal, normalmente medido com os lobos espalmados no prolongamento da linha média; mede-se um segmento de reta, não a curva de contorno do corpo (www.fishbase.org).

Figura 1

Representação dos diversos comprimentos utilizados.



Produto químico: Substância ou mistura.

CE_x (concentração com efeitos em x %): concentração que causa efeitos em x % dos organismos sujeitos a ensaio num determinado período de exposição, comparativamente ao grupo de controlo. Por exemplo, a CE_{50} é a concentração que causa efeitos, num parâmetro ensaiado, em 50 % da população exposta durante o período definido.

Menor concentração com efeitos observáveis (LOEC): menor concentração de ensaio do produto químico em estudo à qual este tem algum efeito com significância estatística ($p < 0,05$), comparativamente ao grupo de controlo. No entanto, todas as concentrações de ensaio superiores à LOEC devem ter efeitos nocivos iguais ou superiores aos verificados à LOEC. Se não estiverem preenchidas estas duas condições, deve explicar-se como se escolheu a LOEC (e a NOEC). Os apêndices 5 e 6 contêm orientações neste domínio.

Concentração sem efeitos observáveis (NOEC): das concentrações ensaiadas, é a mais elevada imediatamente abaixo do LOEC que, comparativamente ao grupo de controlo, não tem nenhum efeito com significância estatística ($p < 0,05$), durante o período de exposição indicado.

Produto químico em estudo: Qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado este método de ensaio.

UVCB: substâncias de composição desconhecida ou variável, produtos de reação complexos ou matérias biológicas.

IUPAC: União Internacional de Química Pura e Aplicada.

SMILES *(Simplified Molecular Input Line Entry Specification)*: Especificação de escrita molecular linear simplificada.

▼M7

Apêndice 2

CONDIÇÕES DE REALIZAÇÃO E DURAÇÃO DO ENSAIO E CRITÉRIOS DE SOBREVIVÊNCIA PARA AS ESPÉCIES RECOMENDADAS

ESPÉCIE	CONDIÇÕES DE REALIZAÇÃO DO ENSAIO			DURAÇÃO RECOMENDADA DO ENSAIO	Valor médio mínimo normal do comprimento total dos peixes de controlo no final do estudo (mm) [1]	TAXA DE SOBREVIVÊNCIA DOS PEIXES DE CONTROLO (% mínima)	
	Temperatura (°C)	Salinidade ($^0/_{00}$)	Fotoperíodo (horas)			Na eclosão	Após a eclosão
De água doce:							
Oncorhynchus mykiss Truta arco-íris	10 ± 1,5 [2]		12-16 [3]	duas semanas após o início da alimentação livre dos peixes de controlo (ou 60 dias, a contar da eclosão)	40	75 %	75 %
Pimephales promelas Vairão-de-cabeça-grande	25 ± 1,5		16	32 dias, a contar do início do ensaio (ou 28 dias, a contar da eclosão)	18	70 %	75 %
Danio rerio Peixe-zebra	26 ± 1,5		12-16 [4]	30 dias, a contar da eclosão	11	70 %	75 %
Oryzias latipes Peixe-do-arroz-japonês	25 ± 2		12-16 [4]	30 dias, a contar da eclosão	17	80 %	80 %
Estuarina ou marinha:							
Cyprinodon variegatus Sargo-choupa	25 ± 1,5	15-35 [5]	12-16 [4]	32 dias, a contar do início do ensaio (ou 28 dias, a contar da eclosão)	17	75 %	80 %
Menidia sp. Peixe-rei	22-25	15-35 [5]	13	28 dias	20	80 %	60 %

Legenda:

[1] O valor médio mínimo normal do comprimento total não constitui critério de validade, mas médias inferiores ao valor indicado devem ser cuidadosamente examinadas em termos de sensibilidade do ensaio. Determinaram-se os valores médios mínimos de comprimento total a partir de uma seleção de dados disponíveis.

[2] A estirpe de truta arco-íris utilizada no ensaio pode exigir outras temperaturas. Os peixes reprodutores devem estar à mesma temperatura que os ovos. Se os ovos provierem de um criador comercial, é necessária uma curta adaptação (1-2 h) à temperatura do ensaio.

[3] Durante a semana seguinte à eclosão, as larvas devem ser mantidas na obscuridade, exceto quando estiverem a ser examinadas; em seguida, mantêm-se sob iluminação coada durante o resto do ensaio (fotoperíodo de 12 a 16 horas) [4].

[4] O programa de iluminação deve ser constante, independentemente das condições de realização do ensaio.

[5] O desvio admissível em qualquer ensaio é de ± $2^0/_{00}$.

▼M7

Apêndice 3

ORIENTAÇÕES RELATIVAS À ALIMENTAÇÃO E À MANIPULAÇÃO DOS PEIXES REPRODUTORES E DOS PEIXES UTILIZADOS NO ENSAIO, DAS ESPÉCIES RECOMENDADAS

ESPÉCIE	ALIMENTAÇÃO (*)				MOMENTO DA TRANSFERÊNCIA, APÓS A ECLOSÃO	MOMENTO DO PRIMEIRO FORNECIMENTO DE ALIMENTOS
	Peixes reprodutores	Larvas recém-eclodidas	Juvenis			
			Tipo	Frequência		
De água doce:						
Oncorhynchus mykiss Truta arco-íris	alimento para trutas	nenhuma ([a])	alimento inicial para trutas, NA	2-4 vezes por dia	14-16 dias após a eclosão ou quando da ascensão (facultativo)	19 dias após a eclosão ou quando da ascensão
Pimephales promelas Vairão-de-cabeça-grande	NA, alimento floculado, AC	NA	NA48, alimento floculado	2-3 vezes por dia	após eclosão de 90 %	2 dias após a eclosão
Danio rerio Peixe-zebra	NA, alimento floculado	alimento comercial para larvas, protozoários ([b]), proteínas ([c])	NA48, alimento floculado	NA uma vez por dia; alimento floculado duas vezes por dia	após eclosão de 90 %	2 dias após a eclosão
Oryzias latipes Peixe-do-arroz-japonês	alimento floculado	NA, alimento floculado (ou protozoários ou rotíferos)	NA48, alimento floculado (ou rotíferos)	NA uma vez por dia; alimento floculado duas vezes por dia ou alimento floculado e rotíferos uma vez por dia	inaplicável	6-7 dias após a eclosão
Estuarina ou marinha:						
Cyprinodon variegatus Sargo-choupa	NA, alimento floculado, AC	NA	NA48	2-3 vezes por dia	inaplicável	1 dia após a eclosão/ascensão
Menidia sp. Peixe-rei	NA48, alimento floculado	NA	NA48	2-3 vezes por dia	inaplicável	1 dia após a eclosão/ascensão

Legenda:

(*) Alimentação a fornecer *ad libitum*. Para evitar a acumulação de resíduos, removem-se, sempre que necessário, o excesso de alimento e as fezes.

AC: Artémias congeladas; adultos de espécies do género *Artemia*.

NA: Náuplios de artémias; recém-eclodidos.

NA48: Náuplios de artémias; com 48 horas.

([a]) As larvas com saco vitelino não necessitam de ser alimentadas.

([b]) Filtrados de uma cultura mista.

([c]) Grânulos de processo fermentativo.

▼M7

Apêndice 4

ALGUMAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DE UMA ÁGUA DE DILUIÇÃO ACEITÁVEL

Componente	Limite de concentração
Partículas	5 mg/l
Carbono orgânico total	2 mg/l
Amoníaco não-ionizado	1 µg/l
Cloro residual	10 µg/l
Pesticidas organofosforados totais	50 ng/l
Soma dos pesticidas organoclorados e dos bifenilos policlorados, totais	50 ng/l
Cloro orgânico total	25 ng/l
Alumínio	1 µg/l
Arsénio	1 µg/l
Crómio	1 µg/l
Cobalto	1 µg/l
Cobre	1 µg/l
Ferro	1 µg/l
Chumbo	1 µg/l
Níquel	1 µg/l
Zinco	1 µg/l
Cádmio	100 ng/l
Mercúrio	100 ng/l
Prata	100 ng/l

▼M7

Apêndice 5

ORIENTAÇÕES ESTATÍSTICAS PARA A DETERMINAÇÃO DA NOEC

Aspetos gerais

Cada cuba replicada constitui uma unidade de análise. Por conseguinte, no caso das medições contínuas, como o tamanho, calcula-se a média ou a mediana de cada replicado, sendo estes os dados a analisar. É necessário demonstrar a representatividade estatística dos testes utilizados, de preferência com fundamento numa base de dados histórica adequada do laboratório. Para cada parâmetro, devem ser indicados o teste estatístico a utilizar e a variação (mínima) de tamanho detetável com 75-80 % de representatividade estatística.

As bases de dados disponíveis aquando da elaboração deste método de ensaio definem a representatividade estatística associável aos métodos estatísticos recomendados. O laboratório deve demonstrar-se capaz de satisfazer o requisito de representatividade estatística mediante a realização de uma análise de representatividade estatística ou comprovando que o coeficiente de variação de cada resposta não vai além do 90.º percentil dos coeficientes de variação utilizados na elaboração do *Test Guideline*, indicados no quadro 1. Caso se disponha apenas de médias ou medianas por replicado, pode ignorar-se o coeficiente de variação nos replicados.

Quadro 1

90.º percentil de coeficientes de variação para espécies de água doce escolhidas.

Espécie	Resposta	Coeficiente de variação entre replicados	Coeficiente de variação nos replicados
Truta arco-íris	Comprimento	17,4	9,8
	Peso	10,1	28
Vairão-de-cabeça-grande	Comprimento	16,9	13,5
	Peso	11,7	38,7
Peixe-zebra	Comprimento	43,7	11,7
	Peso	11,9	32,8

No caso de praticamente todos os testes estatísticos para avaliar estudos toxicológicos realizados em laboratório, as comparações relevantes são entre os grupos expostos e os grupos de controlo. Não se justifica, portanto, exigir um teste F de significância (análise de variância) antes de realizar um teste de Dunnett ou um teste de Williams nem um teste de significância de Kruskal-Wallis antes de realizar um teste de Jonckheere-Terpstra, Mann-Whitney ou Dunn (Hochberg e Tamhane, 1987; Hsu, 1996; Dunnett, 1955, 1964; Williams, 1971, 1972, 1975, 1977; Robertson *et al.*, 1988; Jonckheere, 1954; Dunn, 1964).

O teste de Dunnett permite comparações múltiplas e a utilização de um teste F como filtro prejudica as suas taxas de falsos positivos e de falsos negativos. Analogamente, os testes regressivos de Williams e de Jonckheere-Terpstra com nível de significância de 0,05 em cada etapa mantêm uma taxa global de falsos positivos de 5 %, sendo que esta e a representatividade estatística dos testes são prejudicadas pela utilização, como filtro, do teste F ou do teste de Kruskal-Wallis. O teste de Mann-Whitney e o teste de Dunn têm de ser adaptados para comparações múltiplas, aconselhando-se o ajustamento de Bonferroni-Holm.

A referência «OCDE (2006)» contém vasta bibliografia e um exame aprofundado da maior parte das recomendações sobre testes de hipóteses e sobre a verificação dos pressupostos que lhes estão subjacentes.

▼M7

Tratamento dos grupos de controlo quando se utiliza solvente

Caso se utilize um solvente, é necessário prever um grupo de controlo da água de diluição e um grupo de controlo do solvente. Comparam-se a resposta obtida para o primeiro com a resposta obtida para o segundo; se não apresentarem diferenças com significância estatística, combinam-se um com o outro na análise estatística. Caso contrário, utiliza-se o grupo de controlo do solvente na determinação da NOEC ou na estimativa da CE_x, mas não o grupo de controlo da água de diluição. Ver a restrição enunciada nos critérios de validade (ponto 7).

Para o comprimento, o peso, a proporção de ovos eclodidos, a taxa de mortalidade larvar ou de larvas anormais e o primeiro ou último dia de eclosão ou de ascensão, deve utilizar-se um teste T ou um teste de Mann-Whitney para comparar o grupo de controlo da água de diluição com o grupo de controlo do solvente ao nível de significância de 0,05, ignorando todos os grupos expostos. Os resultados destes testes devem constar do relatório.

Medições relacionadas com o tamanho (comprimento e peso)

O comprimento e o peso dos peixes podem seguir uma distribuição normal ou log-normal. Em qualquer dos casos, o teorema do limite central prevê que os valores médios por replicado tendem para uma distribuição normal, o que é corroborado pelos resultados de mais de 100 estudos nos primeiros estádios de vida realizados em três espécies de água doce. Em alternativa, se os dados ou as bases de dados históricas apontarem para uma distribuição log-normal dos valores relacionados com o tamanho dos peixes, pode calcular-se o logaritmo da média dos valores correspondentes aos peixes que constituem cada replicado, tomando depois como dados a analisar os antilogaritmos desses logaritmos de médias por replicado.

Deve avaliar-se a compatibilidade dos dados com uma distribuição normal e com uma variância homogénea. Para o efeito, devem ser utilizados os resíduos de um modelo ANOVA em que a concentração seja a única variável explicativa. Pode recorrer-se a diagramas de dispersão, histogramas ou diagramas de caule e folha («*stem-and-leaf plots*»). Em alternativa, pode utilizar-se um teste formal, como o teste de Shapiro-Wilk ou o teste de Anderson-Darling. Pode avaliar-se a compatibilidade com uma variância homogénea através de um exame visual do mesmo diagrama de dispersão ou, formalmente, por meio de um teste de Levene. A verificação da normalidade e da homogeneidade da variância só é necessária no caso dos testes paramétricos (teste de Williams ou teste de Dunnett, por exemplo).

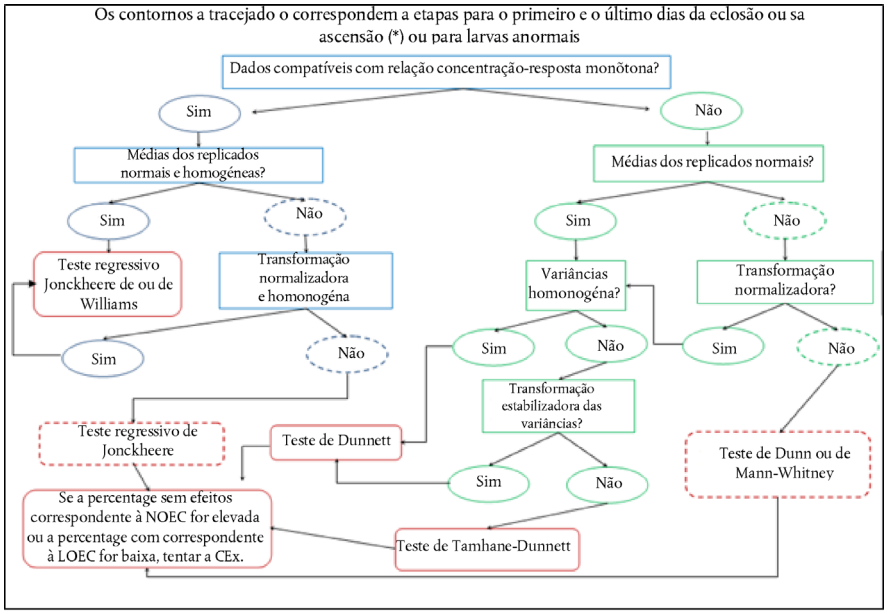
É necessário estar atento a eventuais valores aberrantes e às implicações destes na análise. Pode recorrer-se ao teste de valores aberrantes de Tukey e ao exame visual dos já referidos diagramas de resíduos. Relembra-se que a observação corresponde ao replicado completo, pelo que a exclusão de valores aberrantes da análise carece de cuidadosa ponderação.

Os testes estatísticos assentes nas características do protocolo experimental e nas expectativas biológicas são testes de tendência regressivos, como o de Williams ou o de Jonckheere-Terpstra. Estes testes pressupõem uma relação concentração-resposta monótona, pelo que há que avaliar a compatibilidade dos dados com este pressuposto. A avaliação pode ser por exame visual do diagrama de dispersão das médias por replicado, em função da concentração ensaiada. Será útil sobrepor a esse diagrama um diagrama linear por segmentos que ligue as médias de concentração, ponderadas em função da dimensão da amostra colhida do replicado. Se esse diagrama por segmentos se desviar muito de um traçado monótono, poderá ser necessário recorrer a testes que não sejam de tendência. Em alternativa, pode recorrer-se a testes formais. Um teste formal simples passa por calcular os contrastes lineares e quadráticos das médias de concentração. Se o contraste quadrático tiver significância e o contraste linear não a tiver, poderá haver um problema de monotonia, a reavaliar com base nos ditos diagramas. Caso haja dúvidas quanto à normalidade ou à homogeneidade da variância, os referidos contrastes podem ser construídos a partir de dados resultantes de uma transformação de ordenamento. Podem ser utilizados outros métodos, como o teste de monotonia de Bartholomew, mas com aumento de complexidade.

▼M7

Figura 2

Fluxograma para determinar a NOEC com base em medições relacionadas com o tamanho (comprimento e peso).



(*) Estas respostas nunca satisfazem os pressupostos de modelos ou análises paramétricos.

A menos que os dados não sejam compatíveis com os requisitos desses testes, determina-se a NOEC por aplicação regressiva do teste de Williams ou do teste de Jonckheere-Terpstra. A referência «OCDE (2006)» fornece mais elementos sobre a aplicação destes métodos. Se os dados não forem compatíveis com os requisitos de um teste de tendência regressivo, pode utilizar-se o teste de Dunnett ou o teste de Tamhane-Dunnett (T3), ambos com possibilidade de comparações múltiplas. Estes testes pressupõem uma distribuição normal e, no caso do teste de Dunnett, homogeneidade da variância. Se estas condições não forem satisfeitas, pode recorrer-se ao teste não-paramétrico de Dunn. A referência «OCDE (2006)» fornece mais elementos sobre todos estes testes. A figura 2 explica, em linhas gerais, como se pode escolher o teste adequado.

Eclosão, sobrevivência das larvas

Os dados a analisar são as proporções de ovos que eclodem ou de larvas que sobrevivem em cada replicado. Estas proporções devem ser avaliadas em termos de variância extrabinomial, que é frequente, mas não universal, nestes dois casos. O fluxograma da figura 3 constitui uma orientação para a escolha do teste adequado; completa-o o texto explicativo.

São dois os testes normalmente utilizados: o teste C(α) de Tarone (Tarone, 1979) e os testes de chi-quadrado, cada um deles aplicado separadamente a cada concentração de ensaio. Caso se observe variância extrabinomial, ainda que apenas numa concentração de ensaio, devem utilizar-se métodos que a contemplem.

Fórmula 1

Teste C(α) de Tarone (Tarone, 1979).

$$Z = \frac{\sum_{j=1}^{m} \frac{(x_j - n_j \hat{p})^2}{\hat{p}(1-\hat{p})} - \sum_{j=1}^{m} n_j}{\left\{2\sum_{j=1}^{m} n_j(n_j-1)\right\}^{1/2}}$$

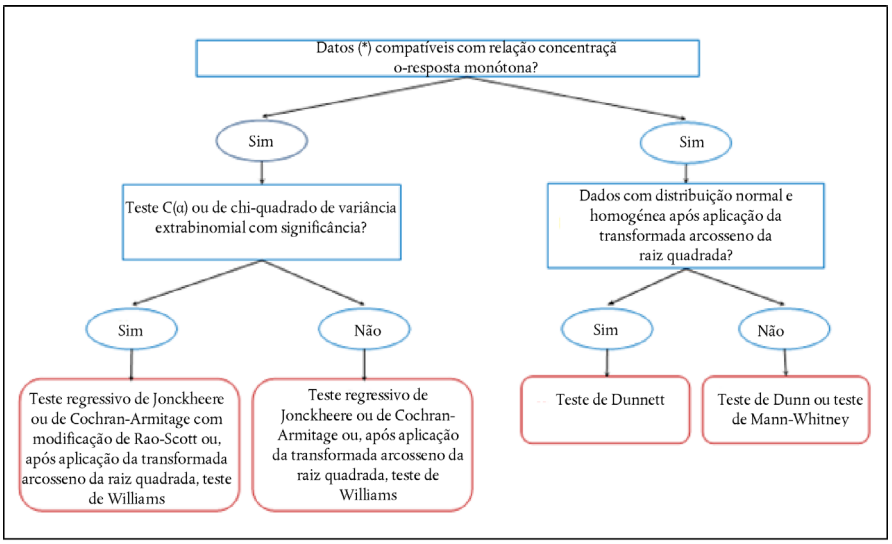
em que $\hat{p}$ é a proporção média correspondente a uma determinada concentração, **m** é o número de cubas replicadas, $\mathbf{n_j}$ é o número de sujeitos presentes no

▼M7

replicado **j** e x_j é o número de sujeitos respondentes nesse replicado, isto é, os casos de não-eclosão ou de morte no replicado. Aplica-se este teste separadamente a cada concentração. Pode considerar-se um teste de chi-quadrado corrigido, mas um certo número de simulações de representatividade estatística efetuadas por Tarone mostraram ser um teste mais poderoso que um teste de chi-quadrado.

Figura 3

Fluxograma para determinar a NOEC com base na eclosão dos ovos e na mortalidade larvar.



(*) Os dados a analisar são as proporções por replicado.

Caso não haja indícios significativos de variância extrabinomial, pode utilizar-se o teste regressivo de Cochran-Armitage. Uma vez que este ignora os replicados, recomenda-se que, caso haja indícios significativos de variância extrabinomial, lhe seja aplicada a correção de Rao-Scott, que tem em conta os replicados, a dimensão destes e a variância extrabinomial. Outras possibilidades são os testes regressivos de Williams e de Jonckheere-Terpstra, bem como o teste de Dunnett, conforme referido no item «Medições relacionadas com o tamanho». Estes testes podem ser utilizados caso exista variância extrabinomial ou não, mas a sua representatividade estatística é menor (Agresti, 2002; Morgan, 1992; Rao e Scott, 1992, 1999; Fung *et al.*, 1994, 1996).

Primeiro ou último dia de eclosão e ascensão

A resposta a analisar é um número inteiro, correspondente ao dia do ensaio no qual a observação indicada é feita na cuba replicada em causa. Em geral, a gama de valores é muito limitada e são frequentes proporções elevadas de valores ligados (por exemplo, observação do mesmo primeiro dia de eclosão em todos os replicados de controlo e, possivelmente, também na concentração mais baixa ou nas duas concentrações mais baixas). Testes paramétricos, como o de Williams ou o de Dunnett, não se adequam a este tipo de dados. A menos que haja indícios de acentuada não-monotonia, o teste regressivo de Jonckheere-Terpstra é muito poderoso na deteção de efeitos de produtos químicos. Caso contrário, pode utilizar-se o teste de Dunn.

Larvas com anomalias

A resposta a analisar é o número de larvas em que foi detetada alguma anomalia. Esta resposta tem uma incidência muitas vezes baixa e estão-lhe associados os mesmos problemas que ao primeiro dia de eclosão, bem como, por vezes, uma relação concentração-resposta errática. Se os dados se relacionarem segundo uma função aproximadamente monótona da concentração, o teste regressivo de Jonckheere-Terpstra é poderoso na deteção de efeitos. Caso contrário, pode utilizar-se o teste de Dunn.

▼**M7**

REFERÊNCIAS

Agresti, A. (2002). Categorical Data Analysis, segunda edição. Wiley, Hoboken.

Dunnett, C.W. (1955). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. *J. American Statistical Association*, 50, 1096-1121.

Dunn O.J. (1964). Multiple Comparisons Using Rank Sums. *Technometrics*, 6, 241-252.

Dunnett, C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics*, 20, 482-491.

Fung, K.Y., Krewski, D., Rao, J.N.K., Scott, A.J. (1994). Tests for Trend in Developmental Toxicity Experiments with Correlated Binary Data. *Risk Analysis*, 14, 639-648.

Fung, K.Y, Krewski, D., Smythe, R.T. (1996). A comparison of tests for trend with historical controls in carcinogen bioassay. *Canadian Journal of Statistics*, 24, 431-454.

Hochberg, Y., Tamhane, A.C. (1987). Multiple Comparison Procedures. Wiley, Nova Iorque.

Hsu, J.C. (1996). Multiple Comparisons: Theory and Methods. Chapman and Hall/CRC Press, Boca Raton.

Jonckheere, A.R. (1954). A distribution-free k-sample test against ordered alternatives. *Biometrika*, 41, 133.

Morgan, B.J.T. (1992). Analysis of Quantal Response Data. Chapman and Hall, Londres.

OCDE (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application. Series on Testing and Assessment, No. 54. Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Económicos (OCDE), Paris.

Rao J.N.K., Scott, A.J. (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. *Biometrics*, 48, 577-585.

Rao J.N.K., Scott, A.J. (1999). A simple method for analyzing overdispersion in clustered Poisson data. *Statistics in Medicine*, 18, 1373-1385.

Robertson, T., Wright, F.T., Dykstra, R.L. (1988). Order restricted statistical inference. Wiley.

Tarone, R.E. (1979). Testing the goodness of fit of the Binomial distribution. *Biometrika*, 66, 585-590.

Williams, D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics*, 27, 103-117.

Williams, D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics*, 28, 519-531.

Williams, D.A. (1975). The Analysis of Binary Responses from Toxicological Experiments Involving Reproduction and Teratology. *Biometrics*, 31, 949-952.

Williams, D.A. (1977). Some inference procedures for monotonically ordered normal means. *Biometrika*, 64, 9-14.

▼M7

Apêndice 6

ORIENTAÇÕES ESTATÍSTICAS PARA AS ESTIMATIVAS POR REGRESSÃO

Aspetos gerais

As observações às quais se ajusta um modelo são as médias (de comprimento e de peso) por replicado ou as proporções (de eclosão dos ovos e de mortalidade larvar) por replicado (OCDE, 2006).

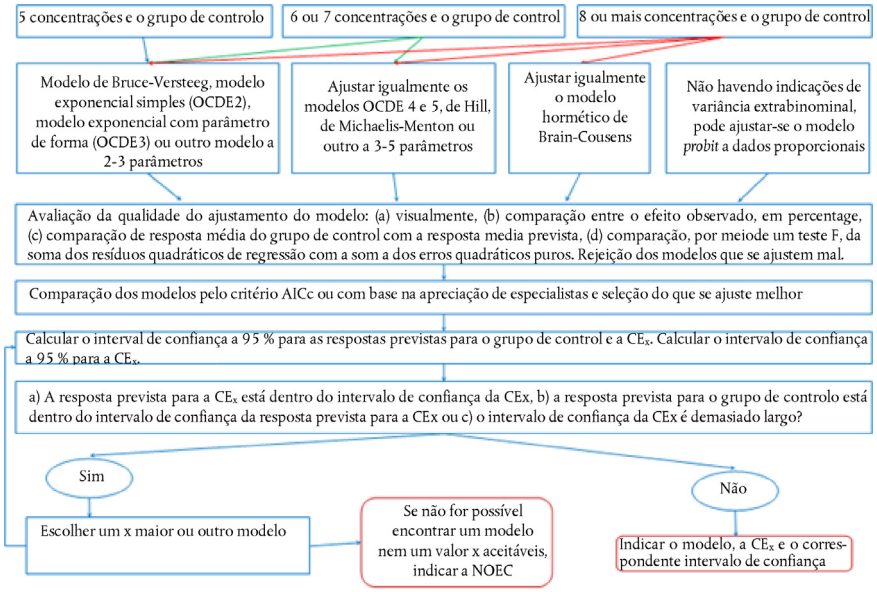
Recomenda-se, em geral, uma regressão ponderada, utilizando como fator de ponderação a dimensão da amostra do replicado. Há outras possibilidades de ponderação; por exemplo: utilizando como fator de ponderação a resposta média prevista ou uma combinação desta e da dimensão da amostra do replicado. Não se recomenda a ponderação por meio do inverso da variância das amostras a cada concentração (Bunke *et al.*, 1999; Seber e Wild, 2003; Motulsky e Christopoulos, 2004; Huet *et al.*, 2003).

Qualquer transformação das respostas antes da análise estatística deve manter a independência das observações; além disso, a CE_x e os limites do intervalo de confiança desta devem ser expressos nas unidades de medida originais e não em unidades transformadas. Por exemplo, uma variação de 20 % do logaritmo do comprimento não equivale a uma variação de 20 % do comprimento (Lyles *et al.*, 2008; Draper e Smith, 1999).

O fluxograma da figura 4 resume como proceder a estimativas de CE_x. Completam-no as explicações dadas no texto.

Figura 4

Fluxograma para estimativa da CE_x em função das médias por replicado de comprimento, peso ou proporção de eclosão dos ovos ou de mortalidade larvar (mais pormenores no texto).



Considerações relativas à eclosão dos ovos e à mortalidade larvar

Para a eclosão dos ovos e a mortalidade larvar, é geralmente preferível ajustar um modelo decrescente, a menos que se pretenda ajustar um modelo *probit* como se descreve a seguir. Ou seja, deve ajustar-se o modelo à proporção de ovos não-eclodidos ou de larvas mortas. A razão disto é que a CE_x se refere à concentração à qual se verifica uma variação de x % em relação à resposta média do grupo de controlo. Se 5 % dos ovos do grupo de controlo não eclodirem e o modelo traduzir a não-eclosão, a CE_{20} corresponderá à concentração à qual ocorrerá uma variação de 20 % da proporção de 5 % de ovos não-eclodidos no grupo de controlo, ou seja, uma variação de $0,2 \times 0,05 = 0,01$, o que representa

▼M7

um aumento de um ponto percentual, para 6 % de não-eclosões. Uma variação tão pequena não pode ser estimada de modo significativo a partir dos dados disponíveis e não tem relevância biológica. Em contrapartida, se o modelo traduzir a proporção de ovos eclodidos, a proporção correspondente ao grupo de controlo será, neste exemplo, de 95 %, e uma redução de 20 % em relação à média do grupo de controlo equivaleria a uma variação de 0,95 × 0,2 = 0,18, ou seja, uma variação do êxito da eclosão de 95 % para 77 % (= 95 – 18), podendo estimar-se a concentração que gera este efeito, previsivelmente de maior interesse. O problema não se coloca com as medições relacionadas com o tamanho; efeitos adversos no tamanho traduzem-se geralmente numa diminuição deste.

Modelos aplicáveis ao tamanho (comprimento ou peso) e ao êxito da eclosão dos ovos ou à sobrevivência larvar

Com exceção do modelo hormético de Brain-Cousens, todos estes modelos são descritos e recomendados na referência «OCDE (2006)». Discutem-se igualmente os modelos OCDE 2 a 5 para experiências de ecotoxicidade em Slob (2002). Há, evidentemente, muitos outros modelos que poderão ser úteis. Bunke *et al.* (1999) enumeram uma vasta série de modelos que não são aqui referidos, e há numerosas referências a outros modelos. Os modelos a seguir referidos são considerados especialmente adequados para experiências de ecotoxicidade e amplamente utilizados.

5 concentrações de ensaio e grupo de controlo

— modelo de Bruce-Versteeg;

— modelo exponencial simples (OCDE 2);

— modelo exponencial com parâmetro de forma (OCDE 3);

— modelo exponencial simples com limite inferior (OCDE 4).

6 ou mais concentrações de ensaio e grupo de controlo

— modelo exponencial com parâmetro de forma e limite inferior (OCDE 5);

— modelo de Michaelis-Menten;

— modelo de Hill.

Caso exista prova visual de hormese (improvável no caso da eclosão dos ovos ou da sobrevivência larvar, mas por vezes evidenciada nas observações relacionadas com o tamanho):

— modelo hormético de Brain-Cousens — Brain e Cousens (1989).

Modelos alternativos para a não-eclosão dos ovos e a mortalidade larvar

— Caso não haja indícios de variância extrabinomial, podem ser ajustados a estas respostas modelos crescentes *probit* (ou logísticos), sendo a incidência no grupo de controlo estimada no ajustamento do modelo. Não é este o método a privilegiar, por considerar que a unidade de análise é, não o replicado, mas o indivíduo (Morgan, 1992; O'Hara Hines e Lawless, 1993; Collett, 2002, 2003).

Qualidade do ajustamento de um modelo

— Comparação visual do decréscimo percentual, observado e previsto, correspondente a cada concentração ensaiada (Morgan, 1992; O'Hara Hines e Lawless, 1993; Collett, 2002, 2003).

— Comparação, por meio de um teste F, do erro quadrático médio de regressão com o erro quadrático médio puro (Draper e Smith, 1999).

— Verificação de que cada termo do modelo se distingue, com significância, de zero (ou seja, determinação da importância de todos os termos do modelo) (Motulsky e Christopoulos, 2004).

▼M7

— Representação gráfica dos resíduos da regressão em função da concentração de ensaio, recorrendo eventualmente a uma escala logarítmica da concentração. Esta representação não deve definir nenhum padrão; os pontos devem estar dispersos de modo aleatório segundo uma linha horizontal à altura zero.

— Avaliação da normalidade da distribuição e da homogeneidade da variância dos dados como se indicou no apêndice 5.

— Em acréscimo, avaliação da normalidade da distribuição dos resíduos do modelo de regressão, pelos métodos indicados no apêndice 5 para os resíduos de um modelo ANOVA.

Comparação de modelos

— Utilização dos critérios AICc de Akiake. Valores AICc menores traduzem melhores ajustamentos; se AICc(B)-AICc(A) ≥ 10, o modelo A é quase seguramente melhor do que o modelo B (Motulsky e Christopoulos, 2004);

— Comparação visual dos dois modelos quanto à satisfação dos critérios acima indicados para um modelo;

— Aplicação recomendada do princípio da parcimónia, segundo o qual se deve utilizar o modelo mais simples que se ajuste razoavelmente aos dados (Ratkowsky, 1993; Lyles *et al.*, 2008).

Qualidade da estimativa de CE_x

O intervalo de confiança da CE_x não deve ser demasiado amplo. É necessário ajuizar, em termos estatísticos, que amplitude máxima pode ter o intervalo de confiança para que a CE_x tenha utilidade. Simulações do ajustamento de modelos de regressão a dados de eclosão dos ovos e a dados relacionados com o tamanho mostram que a amplitude de cerca de 75 % dos intervalos de confiança de CE_x (x = 10, 20 ou 30) não excede duas concentrações de ensaio. Esta conclusão constitui uma orientação geral de aceitabilidade e dá uma ideia do que é realizável. Numerosos autores vincam a necessidade de dar conta dos intervalos de confiança de todos os parâmetros do modelo e afirmam que parâmetros do modelo com intervalos de confiança largos são indicadores da inaceitabilidade do modelo (Ott e Longnecker, 2008; Alvord e Rossio, 1993; Motulsky e Christopoulos, 2004; Lyles *et al.*, 2008; Seber e Wild, 2003; Bunke *et al.*, 1999; Environment Canada, 2005).

O intervalo de confiança correspondente à CE_x (ou a qualquer outro parâmetro do modelo) não deve compreender o valor zero (Motulsky e Christopoulos, 2004). Trata-se do equivalente, na regressão, da diferença mínima com significância frequentemente referida nos métodos de teste de hipóteses (por exemplo: Wang *et al.*, 2000). Corresponde igualmente a que o intervalo de confiança das respostas médias à LOEC não compreenda a média do grupo de controlo. Importa refletir sobre a plausibilidade científica das estimativas dos parâmetros. Por exemplo, se o intervalo de confiança correspondente a y_0 for ±20 %, nenhuma estimativa de CE_{10} será plausível. Se o modelo previr um efeito a 20 % à concentração C e o efeito máximo observado a essa concentração e a concentrações inferiores for 10 %, a CE_{20} não será plausível (Motulsky e Christopoulos, 2004; Wang *et al.*, 2000; Environment Canada, 2005).

A CE_x não é extrapolável para concentrações que não sejam positivas [Draper e Smith, 1999; OCDE (2006)]. Por exemplo, uma orientação geral poderá ser que a CE_x não seja inferior em mais de 25 % à menor das concentrações ensaiadas nem superior em mais de 25 % à maior destas.

REFERÊNCIAS

Alvord, W.G., Rossio, J.L. (1993). Determining confidence limits for drug potency in immunoassay. *Journal of Immunological Methods*, 157, 155-163.

Brain, P., Cousens, R. (1989). An equation to describe dose responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed res.*, 29:93-96.

▼M7

Bunke, O., Droge, B., Polzehl, J. (1999). Model selection, transformations and variance estimation in nonlinear regression. *Statistics*, 33, 197-240.

Collett, D. (2002). Modelling Binary Data, segunda edição. Chapman and Hall, Londres.

Collett, D. (2003). Modelling Survival Data in Medical Research, segunda edição. Chapman and Hall, Londres.

Draper, N.R., Smith, H. (1999). Applied Regression Analysis, terceira edição. John Wiley & Sons, Nova Iorque.

Environment Canada (2005). Guidance Document on Statistical Methods for Environmental Toxicity Tests. Report EPS 1/RM/46.

Huet, S., Bouvier, A., Poursat, M.-A., Jolivet, E. (2003). Statistical Tools for Nonlinear Regression: A Practical Guide with S-PLUS and R Examples. Springer Series in Statistics, Nova Iorque.

Lyles, R.H., Poindexter, C., Evans, A., Brown, M., Cooper, C.R. (2008). Nonlinear Model-Based Estimates of IC50 for Studies Involving Continuous Therapeutic Dose-Response Data. *Contemp. Clin. Trials*, novembro de 2008, 29(6):878–886.

Morgan, B.J.T. (1992). Analysis of Quantal Response Data. Chapman and Hall, Londres.

Motulsky, H., Christopoulos, A. (2004). Fitting Models to Biological Data Using Linear and Nonlinear Regression: A Practical Guide to Curve Fitting. Oxford University Press, E.U.A.

O'Hara Hines, R.J., Lawless, J.F. (1993). Modelling Overdispersion in Toxicological Mortality Data Grouped over Time. *Biometrics*, vol. 49, pp. 107-121.

OCDE (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application. Series Testing and Assessment, No. 54. Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Económicos (OCDE), Paris.

Ott, R.L., Longnecker, M.T (2008). An Introduction to Statistical Methods and Data Analysis — sexta edição. Brooks-Cole, Belmont, CA.

Ratkowsky, D.A. (1993). Principles of nonlinear regression. *Journal of Industrial Microbiology*, 12, 195-199.

Seber, G.A.F., Wild, C.J. (2003). Nonlinear Regression. Wiley.

Slob, W. (2002). Dose-response modelling of continuous endpoints. *Toxicol. Sci.*, 66, 298-312.

Wang, Q., Denton, D.L., Shukla, R. (2000). Applications and Statistical Properties of Minimum Significant Difference-Based Criterion Testing in a Toxicity Testing Program. *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 19, pp. 113–117, 2000.

▼M7

C.48. ENSAIO CURTO DE EFEITOS NA REPRODUÇÃO EM PEIXES

INTRODUÇÃO

1. Este método de ensaio é equivalente ao *Test Guideline* 229 (2012) da OCDE. A necessidade de desenvolver e validar um ensaio em peixes capaz de detetar produtos químicos com atividade endócrina decorre dos receios acerca da possibilidade de os níveis ambientais dos produtos químicos em causa terem efeitos indesejados nas populações humanas e na fauna e flora selvagens, devido a interações dos referidos produtos químicos com o sistema endócrino. Em 1998, a OCDE deu início a uma ação de elevada prioridade com vista a rever as orientações existentes e a elaborar novas orientações para despistagem e ensaio de potenciais desreguladores do sistema endócrino. Um dos elementos dessa ação foi a elaboração de um *Test Guideline* para a despistagem de produtos químicos com atividade no sistema endócrino de espécies ictiológicas. O Ensaio Curto de Efeitos na Reprodução em Peixes foi objeto de um vasto programa de validação, que consistiu em realizar estudos interlaboratoriais com determinados produtos químicos para demonstrar a pertinência e a fiabilidade do ensaio na deteção de produtos químicos que afetem a reprodução dos peixes por vários mecanismos, nomeadamente por via endócrina (1) (2) (3) (4) (5). Os parâmetros das referidas orientações da OCDE foram todos validados no vairão-de-cabeça-grande e parte deles no peixe-do-arroz-japonês (vitelogenina e caracteres sexuais secundários) e no peixe-zebra (vitelogenina). O trabalho de validação foi objeto de uma avaliação por pares no âmbito de um painel de peritos nomeados pelos coordenadores nacionais do programa de *Test Guidelines* da OCDE (6) e por um painel independente de peritos constituído por iniciativa da Agência de Proteção do Ambiente, dos E.U.A. Este ensaio não visa identificar mecanismos específicos de desregulação hormonal, pois os animais ensaiados possuem um eixo hipotálamo-hipófise-gónadas intacto e são passíveis de reagir (a diversos níveis) aos produtos químicos com efeitos nesse eixo.

2. Este método descreve um ensaio de despistagem *in vivo* que compreende a exposição, ao produto químico, de grupos mistos de machos sexualmente maduros e fêmeas reprodutoras, durante um período limitado (21 dias) do ciclo de vida dos peixes utilizados. Ao terminar o período de 21 dias de exposição, medem-se nos machos e fêmeas dois parâmetros biomarcadores indicativos de atividade endócrina do produto químico em estudo, designadamente a vitelogenina e caracteres sexuais secundários. Mede-se a vitelogenina no vairão-de-cabeça-grande, no peixe-do-arroz-japonês e no peixe-zebra; medem-se os caracteres sexuais secundários no vairão-de-cabeça-grande e no peixe-do-arroz-japonês. Durante o ensaio, monitoriza-se ainda, diariamente, a fecundidade em termos quantitativos. Conservam-se as gónadas e podem realizar-se exames histopatológicos para avaliar a aptidão reprodutiva dos animais em estudo e complementar os indícios extraídos de outros parâmetros.

3. Este bioensaio serve de ensaio de despistagem *in vivo* de efeitos na reprodução, enquadrando-se a sua aplicação no contexto do quadro conceptual da OCDE para ensaio e avaliação de produtos químicos desreguladores do sistema endócrino (30). Nesse quadro conceptual, o Ensaio Curto de Efeitos na Reprodução em Peixes inscreve-se no nível 3, enquanto ensaio *in vivo* que fornece dados acerca de um ou mais mecanismos/vias endócrinos determinados.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES

4. As fêmeas de vertebrados ovíparos produzem normalmente vitelogenina (VTG) no fígado como reação aos estrogénios endógenos em circulação. Trata-se de um precursor das proteínas do vitelo que, uma vez produzido no fígado, é transportado pela corrente sanguínea até aos ovários, onde os ovócitos em desenvolvimento o absorvem e modificam. A vitelogenina é quase indetetável no plasma de peixes fêmeas imaturas e de peixes machos, que não têm estrogénios suficientes em circulação. Porém, o fígado é capaz de sintetizar e segregar vitelogenina como reação a uma estimulação estrogénica exógena.

▼M7

5. A medição da vitelogenina serve para detetar produtos químicos com vários modos de ação estrogénica. É possível detetar produtos químicos estrogénicos medindo a indução de vitelogenina em peixes machos, método documentado em numerosas publicações científicas pré-avaliadas por especialistas — por exemplo (7). Também se demonstrou a indução de vitelogenina após exposição a androgénios aromatizáveis (8) (9). A diminuição do nível de estrogénios em circulação nas fêmeas (por exemplo: através da inibição da aromatase, que converte o androgénio endógeno no estrogénio natural 17β--estradiol) provoca uma diminuição do nível de vitelogenina, efeito que é utilizado para detetar produtos químicos com propriedades inibidoras da aromatase (10) (11). As consequências biológicas de uma inibição estrogénica/da aromatase no nível de vitelogenina são um facto assente e estão amplamente documentadas. Todavia, a produção de vitelogenina nas fêmeas também pode ser afetada por toxicidade generalizada e por modos de ação tóxica não-endócrinos (por exemplo: hepatotoxicidade).

6. Desenvolveram-se e normalizaram-se com êxito vários métodos de medição para ensaios de rotina. É o caso dos métodos ELISA específicos para uma determinada espécie, que recorrem a processos imunoquímicos para quantificar a vitelogenina produzida em pequenas amostras hepáticas ou de sangue colhidas em peixes da espécie em causa (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18). Para a medição da vitelogenina, colhem-se/constituem-se amostras de sangue (vairão-de-cabeça-grande), de sangue ou de homogeneizado da cabeça e da cauda (peixe-zebra) ou do fígado (peixe-do-arroz-japonês). No peixe-do-arroz-japonês existe boa correlação entre a vitelogenina medida no sangue e no fígado (19). Descrevem-se no apêndice 6 os procedimentos recomendados para a colheita de amostras destinadas à análise da vitelogenina. É fácil encontrar *kits* para medição da vitelogenina, os quais, porém, devem basear-se num método ELISA validado para a espécie em causa.

7. Em determinadas espécies de peixes, os caracteres sexuais secundários dos machos são visíveis exteriormente, são quantificáveis e reagem aos níveis de androgénios endógenos em circulação. É o caso no vairão-de-cabeça-grande e no peixe-do-arroz-japonês, mas não no peixe-zebra, que não possui caracteres sexuais secundários quantificáveis. As fêmeas conservam a capacidade de desenvolver caracteres sexuais secundários masculinos quando expostas a produtos químicos androgénicos na água. Estão disponíveis na literatura científica vários estudos que documentam este tipo de resposta no vairão--de-cabeça-grande (20) e no peixe-do-arroz-japonês (21). Por razões de baixa representatividade estatística, um decréscimo dos caracteres sexuais secundários nos machos deve ser interpretado com precaução, com base na apreciação de especialistas na matéria e na ponderação da suficiência da prova. A utilização do peixe-zebra neste ensaio tem as suas limitações, por inexistência de caracteres sexuais secundários quantificáveis reativos a produtos químicos com atividade androgénica.

8. No vairão-de-cabeça-grande, o principal indicador de exposição a androgénios exógenos é o número de tubérculos nupciais existentes no focinho das fêmeas. No peixe-do-arroz-japonês, é o número de processos papilares que constitui o principal marcador da exposição exógena de fêmeas a produtos químicos androgénicos. Descrevem-se nos apêndices 5A e 5B os procedimentos recomendados para avaliar caracteres sexuais respetivamente no vairão-de-cabeça-grande e no peixe-do-arroz-japonês.

9. O ensaio a 21 dias em peixes compreende a determinação quantitativa da produção de ovos e a preservação das gónadas para exame histopatológico (facultativo). Algumas autoridades reguladoras podem exigir este parâmetro adicional para uma avaliação mais completa da aptidão reprodutiva dos animais em estudo ou nos casos em que os parâmetros «vitelogenina» e «caracteres sexuais secundários» não respondam à exposição ao produto químico. Embora determinados parâmetros tenham elevado valor de diagnóstico (indução de vitelogenina em machos e formação de tubérculos em fêmeas), nem todos os parâmetros contemplados no ensaio (fecundidade e histopatologia das gónadas) visam identificar inequivocamente um mecanismo específico de ação celular. Em vez disso, a série de parâmetros utilizada permite, no seu conjunto, tirar ilações acerca de eventuais perturbações endócrinas, que possam servir de orientação para ensaios complementares. Embora não seja afetada unicamente

▼M7

por perturbações endócrinas, a fecundidade constitui um parâmetro importante deste ensaio, dada a sua comprovada sensibilidade aos produtos químicos com atividade endócrina conhecida (5). Se a fecundidade e outros parâmetros não forem afetados, haverá mais razões para concluir pela improbabilidade de o composto em causa ter atividade endócrina. Porém, se a fecundidade for afetada, essa constatação influenciará fortemente as ilações extraíveis dos resultados obtidos. Na restante descrição deste método de ensaio estabelecem-se orientações sobre a interpretação dos dados e a aceitação de resultados experimentais.

10. No apêndice 1 definem-se alguns conceitos utilizados neste método.

PRINCÍPIO DO ENSAIO

11. Expõem-se conjuntamente nas cubas de ensaio peixes machos e fêmeas em estádio reprodutor. Tratando-se de animais adultos reprodutores, é possível distinguir claramente um sexo do outro, o que possibilita uma análise de cada parâmetro em função do sexo, e garante-se a sensibilidade dos animais a produtos químicos exógenos. No final do ensaio, confirma-se o sexo por exame macroscópico das gónadas, após incisão abdominal com uma tesoura. O apêndice 2 recapitula as condições experimentais relevantes do bioensaio. Normalmente, inicia-se o ensaio com uma amostra de uma população de peixes capazes de procriar. Não se utilizam peixes senescentes. O ponto que aborda adiante a seleção dos peixes dá indicações sobre a idade dos peixes e o estado reprodutivo destes. Realiza-se o ensaio com três concentrações de exposição ao produto químico em estudo, uma cuba de controlo da água e, se necessário, uma cuba de controlo do solvente. No caso do peixe-zebra, utilizam-se duas cubas (replicados) por concentração de exposição (contendo cada cuba cinco machos e cinco fêmeas). No caso do vairão-de-cabeça-grande, utilizam-se quatro cubas (replicados) por concentração de exposição (contendo cada cuba dois machos e quatro fêmeas). Tem-se, assim, em conta o comportamento territorial do vairão-de-cabeça-grande macho, garantindo concomitantemente suficiente representatividade estatística do ensaio. No caso do peixe-do-arroz-japonês, utilizam-se quatro cubas (replicados) por concentração de exposição (contendo cada cuba três machos e três fêmeas). A exposição prolonga-se por 21 dias, procedendo-se à colheita das amostras dos peixes ao vigésimo primeiro dia. Determina-se a fecundidade quantitativamente todos os dias.

12. Todos os peixes são eutanasiados no vigésimo primeiro dia. Medem-se os caracteres sexuais secundários no vairão-de-cabeça-grande e no peixe-do-arroz-japonês (ver os apêndices 5A e 5B). No caso do peixe-zebra e do vairão-de-cabeça-grande, colhem-se amostras de sangue para determinação da vitelogenina; no caso do peixe-zebra, podem colher-se, em alternativa, amostras da cabeça e da cauda, para determinação da vitelogenina no correspondente homogeneizado (apêndice 6). No caso do peixe-do-arroz-japonês, colhem-se amostras do fígado para a análise da vitelogenina (apêndice 6). As gónadas são fixadas *in situ* ou após dissecação, para eventual exame histopatológico (22).

CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO DO ENSAIO

13. Para que os resultados do ensaio possam considerar-se aceitáveis, têm de se cumprir as seguintes condições:

— mortalidade nas cubas de controlo (água ou solvente), no final da exposição: não superior a 10 %;

— concentração de oxigénio dissolvido ao longo do período de exposição: igual ou superior a 60 % do valor da saturação com ar (VSA);

— diferença de temperatura da água entre as diversas cubas de ensaio: não superior a ± 1,5 °C em qualquer momento do período de exposição, não se afastando a temperatura da água de cada cuba mais de 2 °C da temperatura especificada para a espécie utilizada no ensaio (apêndice 2);

— existência de dados demonstrativos de que a concentração em solução do produto químico em estudo se manteve satisfatoriamente num intervalo de ± 20 % relativamente à média dos valores medidos;

▼M7

— existência de elementos comprovativos de que os peixes estão em desova em todos os replicados antes de se iniciar a exposição ao produto químico em estudo, bem como nos replicados de controlo durante o ensaio.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Material e aparelhagem

14. Equipamento normal de laboratório, designadamente o seguinte:

a. Medidores de oxigénio e de pH;

b. Equipamento para determinação da alcalinidade e da dureza da água;

c. Aparelhagem apropriada para controlo da temperatura, de preferência com monitorização contínua;

d. Cubas de um material quimicamente inerte e de capacidade adequada à carga e à densidade de ocupação recomendadas (ver o apêndice 2);

e. Substrato de desova para o vairão-de-cabeça-grande e o peixe-zebra (ver os pormenores necessários no apêndice 4);

f. Balança de precisão apropriada (isto é, com uma aproximação de ±0,5 mg).

Água

15. Pode utilizar-se no ensaio qualquer água na qual a espécie em estudo apresente taxas adequadas de crescimento e de sobrevivência a longo prazo. A qualidade da água deve manter-se constante durante o ensaio. O pH da água deve situar-se entre 6,5 e 8,5, mas, durante um ensaio, não deve sofrer variações superiores a ± 0,5 unidades de pH. Para assegurar que a água de diluição não influencia indevidamente os resultados do ensaio (por exemplo, por complexação do produto químico em estudo), devem ser colhidas regularmente amostras para análise. Deve determinar-se o teor de metais pesados (Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni etc.), dos principais aniões e catiões (Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, SO_4^{2-} etc.), de pesticidas (pesticidas organofosforados totais, pesticidas organoclorados totais etc.), de carbono orgânico total e de sólidos em suspensão. Se a qualidade da água de diluição se mantiver relativamente constante, estas medições podem realizar-se, por exemplo, de três em três meses. Caso a qualidade da água se tenha comprovadamente mantido inalterada durante, pelo menos, um ano, estas determinações podem ser menos frequentes (de seis em seis meses, por exemplo). No apêndice 3 apresentam-se algumas características químicas de uma água de diluição aceitável.

Soluções utilizadas no ensaio

16. Preparam-se as soluções a utilizar no ensaio por diluição de uma solução de reserva até às concentrações escolhidas. Preferencialmente, prepara-se a solução de reserva por simples mistura ou agitação do produto químico em estudo na água de diluição, utilizando meios mecânicos (agitação ou dispersão ultrassónica, por exemplo). Podem utilizar-se colunas de saturação (colunas de solubilidade) para obter soluções de reserva de concentração adequada. Não se recomenda a utilização de solventes, mas, se for necessário um solvente, há que realizar em paralelo um ensaio deste, com a mesma concentração de solvente que nas cubas de exposição ao produto químico em estudo. No caso dos produtos químicos difíceis de ensaiar, tecnicamente a melhor solução poderá ser o recurso a um solvente, devendo consultar-se o documento de orientações da OCDE sobre ensaios de toxicidade em meio aquático de substâncias e misturas difíceis (23). A escolha do solvente a utilizar depende das propriedades químicas da substância ou mistura em causa. O documento de orientações da OCDE recomenda que não se ultrapasse a concentração de 100 µl/l, o que deve ser respeitado. Importa, porém, referir que um estudo recente (24) veio acentuar as dúvidas acerca da utilização de solventes em ensaios de atividade endócrina. Por conseguinte, recomenda-se que se minimize, tanto quanto tecnicamente possível, a concentração do solvente que eventualmente seja necessário utilizar (a qual depende das propriedades físico-químicas do produto químico em estudo).

▼M7

17. Os ensaios devem decorrer em fluxo contínuo. Neste sistema, tendo em vista a manutenção da série pretendida de concentrações nas cubas de ensaio, é fornecida e diluída continuamente (por exemplo: por meio de uma bomba doseadora, de um diluidor proporcional ou de um sistema saturador) uma solução de reserva do produto químico em estudo. Os caudais da solução de reserva e da água de diluição devem ser verificados regularmente durante o ensaio, de preferência diariamente, e não devem variar mais de 10 % ao longo do ensaio. Não deve utilizar-se tubagem de plástico de baixa qualidade ou outros materiais que possam conter produtos químicos biologicamente ativos. Ao selecionar o material para o sistema de fluxo contínuo, há que ter em conta a possibilidade de adsorção do produto químico em estudo ao material utilizado.

Aclimatação dos peixes

18. Selecionam-se os peixes a utilizar no ensaio a partir de uma população do laboratório (de preferência proveniente do mesmo lote) que tenha sido mantida durante, pelo menos, as duas semanas anteriores ao ensaio em condições de qualidade da água e de iluminação idênticas às que nele se utilizarão. É importante que a taxa de carga e a densidade de ocupação (ver definições no apêndice 1) se adequem à espécie utilizada no ensaio (ver o apêndice 2).

19. Após um período de aclimatação de 48 horas, regista-se a mortalidade e aplicam-se os seguintes critérios:

— mortalidade superior a 10 % da população num período de sete dias: rejeição da totalidade do lote;

— mortalidade de 5 % a 10 % da população: aclimatação durante um período adicional de sete dias; caso se verifique mortalidade superior a 5 % durante este segundo período de sete dias, rejeita-se a totalidade do lote;

— mortalidade inferior a 5 % da população num período de sete dias: aceitação do lote.

20. Durante o período de aclimatação, o período de pré-exposição e o período de exposição, não é ministrado aos peixes nenhum tratamento contra doenças.

Pré-exposição e seleção dos peixes

21. Recomenda-se um período de pré-exposição de uma a duas semanas, durante o qual os peixes são mantidos em cubas semelhantes às que se utilizarão no ensaio. Durante o período de aclimatação e na fase de exposição, os peixes devem ser alimentados *ad libitum*. Inicia-se a fase de exposição utilizando peixes adultos com dimorfismo sexual provenientes de uma população do laboratório de peixes sexualmente maduros (que apresentem, por exemplo, caracteres sexuais secundários claramente visíveis, no caso do vairão-de-cabeça-grande e do peixe-do-arroz-japonês) e efetivamente em desova. Como orientação geral unicamente (que não se deve seguir sem ser complementada pela observação do estado reprodutivo real do lote de peixes em causa), os vairões-de-cabeça-grande devem ter cerca de 20 (± 2) semanas de idade, admitindo que foram mantidos a 25 ± 2 °C durante todo o seu tempo de vida; os peixes-do-arroz-japoneses devem ter cerca de 16 (± 2) semanas de idade, admitindo que foram mantidos a 25 ±2 °C durante todo o seu tempo de vida; os peixes-zebra devem ter cerca de 16 (± 2) semanas de idade, admitindo que foram mantidos a 26 ± 2 °C durante todo o seu tempo de vida. Deve avaliar-se diariamente a produção de ovos durante a fase de pré-exposição. Recomenda-se a observação da desova em todas as cubas replicadas antes de passar à fase de exposição do ensaio. Não é ainda possível fornecer orientações quantitativas sobre a produção diária de ovos desejável, embora seja relativamente comum observar desovas superiores a 10 ovos diários por fêmea. Com vista a uma distribuição equilibrada dos replicados, recomenda-se que, na afetação destes aos diversos níveis de concentração ensaiados, se opte por uma organização em blocos e uma afetação aleatória em cada bloco, em função da produção de ovos.

▼M7

PLANEAMENTO DO ENSAIO

22. Utilizam-se três concentrações do produto químico em estudo, uma cuba de controlo da água e, se necessário, uma cuba de controlo do solvente. É necessário analisar os dados para determinar eventuais diferenças com significância estatística entre as reações verificadas nas cubas expostas ao produto químico em estudo e na(s) cuba(s) de controlo. Mais do que servirem para a avaliação dos riscos, essas análises são úteis para determinar se é necessário pesquisar efeitos indesejados (ao nível da sobrevivência, do desenvolvimento, do crescimento e da reprodução) do produto químico em estudo através de ensaios mais longos (25).

23. No caso do peixe-zebra, recolhem-se amostras no 21.º dia do ensaio dos machos e fêmeas expostos a cada nível de concentração (5 machos e 5 fêmeas de cada duplicado) e da(s) cuba(s) de controlo, para determinação da vitelogenina. No caso do peixe-do-arroz-japonês, recolhem-se amostras no 21.º dia do ensaio dos machos e fêmeas expostos a cada nível de concentração (3 machos e 3 fêmeas de cada quadruplicado) e da(s) cuba(s) de controlo, para determinação da vitelogenina e dos caracteres sexuais secundários. No caso do vairão-de-cabeça-grande, recolhem-se amostras no 21.º dia de exposição dos machos e fêmeas expostos a cada nível de concentração (2 machos e 4 fêmeas de cada quadruplicado) e da(s) cuba(s) de controlo, para determinação da vitelogenina e dos caracteres sexuais secundários. É necessário quantificar a fecundidade; além disso, fixam-se os tecidos das gónadas *in situ* ou após dissecação, para eventual exame histopatológico.

Escolha das concentrações a utilizar no ensaio

24. A concentração mais elevada a utilizar neste ensaio é a mais baixa das seguintes concentrações: concentração máxima tolerada (CMT), obtida num ensaio preliminar de determinação da gama de concentrações a utilizar ou a partir de outros dados de toxicidade; 10 mg/l; solubilidade máxima em água. Define-se a concentração máxima tolerada como a concentração mais elevada do produto químico em estudo que, quando ensaiada, gera menos de 10 % de mortalidade. Esta abordagem pressupõe a existência de dados empíricos de toxicidade aguda ou outros dados de toxicidade a partir dos quais se pode estimar a concentração máxima tolerada. A estimativa da concentração máxima tolerada pode ser inexata e, normalmente, requer uma certa capacidade de apreciação na matéria.

25. Utilizam-se no ensaio três concentrações do produto químico em estudo, intervaladas por um fator constante não superior a 10, uma cuba de controlo da água de diluição e, se necessário, uma cuba de controlo do solvente. Recomenda-se que o fator que define o intervalo entre concentrações se situe entre 3,2 e 10.

PROTOCOLO DE ENSAIO

Seleção e pesagem dos peixes a utilizar no ensaio

26. É importante minimizar a variabilidade dos pesos dos peixes no início do ensaio. Indicam-se no apêndice 2 as gamas de pesos recomendadas para as várias espécies neste ensaio. Se possível, no início do ensaio, o peso de cada peixe macho e de cada peixe fêmea que constituem os peixes utilizados no ensaio não deve afastar-se mais de 20 % da média aritmética dos pesos do sexo correspondente. A fim de estimar o peso médio, recomenda-se a pesagem de uma subamostra do lote de peixes antes de iniciar o ensaio.

Condições de exposição

Duração

27. O ensaio prolonga-se por 21 dias, após um período de pré-exposição. Recomenda-se que este último tenha a duração de uma a duas semanas.

Alimentação

28. Fornece-se aos peixes, *ad libitum*, uma alimentação adequada (apêndice 2), em quantidade e com frequência suficientes para os manter em boas condições físicas. Devem ser tomadas as precauções necessárias para evitar a proliferação de microrganismos e a turvação da água. Como indicação geral, a ração diária, em vez de ser fornecida de uma só vez, pode ser dividida em

▼M7

duas ou três doses iguais, a fornecer com, pelo menos, três horas de intervalo. É aceitável uma dose única maior, nomeadamente nos fins de semana. Não devem ser fornecidos alimentos aos peixes nas doze horas que antecedem a colheita de amostras/a necropsia.

29. É necessário verificar se, nos alimentos fornecidos aos peixes, estão presentes contaminantes, como pesticidas organoclorados, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e bifenilos policlorados. Importa não utilizar alimentos com teor elevado de fitoestrogénios, que comprometeriam a reação obtida no ensaio a um agonista de estrogénios conhecido (por exemplo, o 17b-estradiol).

30. Removem-se os alimentos não ingeridos e as matérias fecais das cubas de ensaio pelo menos duas vezes por semana: por exemplo limpando cuidadosamente o fundo de cada cuba com um sifão.

Luz e temperatura

31. O fotoperíodo e a temperatura da água devem ser adequados à espécie utilizada no ensaio (ver o apêndice 2).

Frequência das medições e das determinações analíticas

32. Antes de iniciar o período de exposição, é necessário verificar se o sistema de distribuição do produto químico está a funcionar bem. Os métodos analíticos necessários devem estar bem estabelecidos, incluindo um conhecimento suficiente da estabilidade do produto químico no sistema de ensaio. Durante o ensaio, determinam-se a intervalos regulares as concentrações do produto químico em estudo, do seguinte modo: de preferência diariamente, mas, pelo menos, duas vezes por semana, verificam-se os caudais do diluente e da solução de reserva do produto químico tóxico, os quais não devem variar mais de 10 % ao longo do ensaio. Recomenda-se a medição das concentrações reais do produto químico em estudo, em todas as cubas, no início do ensaio e, em seguida, semanalmente.

33. Recomenda-se que os resultados se baseiem em concentrações medidas. Todavia, se, durante todo o ensaio, as concentrações em solução do produto químico em estudo não se tiverem desviado, satisfatoriamente, mais de 20 % das concentrações nominais, os resultados podem basear-se nos valores nominais ou nos valores medidos.

34. As amostras podem precisar de ser centrifugadas ou filtradas (utilizando filtros com porosidade de 0,45 μm, por exemplo). Se for necessária uma destas operações, recomenda-se a centrifugação. No entanto, se o produto químico em estudo não se adsorver ao filtro, também é aceitável a filtração.

35. Durante o ensaio, medem-se, pelo menos semanalmente, o oxigénio dissolvido, a temperatura e o pH em cada cuba. Pelo menos uma vez por semana, medem-se a alcalinidade e a dureza total na(s) cuba(s) de controlo e numa das cubas com a concentração mais elevada. De preferência, monitoriza-se a temperatura continuamente em, pelo menos, uma cuba de ensaio.

Exames

36. Avalia-se uma série de reações genéricas (por exemplo a sobrevivência) e biológicas (por exemplo os níveis de vitelogenina) no decurso ou no termo do ensaio. É necessário determinar a fecundidade, quantitativamente, todos os dias. Descreve-se a seguir o modo de medição e de avaliação destes parâmetros e a utilidade dos mesmos.

Sobrevivência

37. Examinam-se diariamente os peixes ao longo do ensaio, registam-se os casos de mortalidade e retiram-se os peixes mortos o mais rapidamente possível. Os peixes mortos em qualquer das cubas (de exposição ou de controlo) não são substituídos. Determina-se o sexo dos peixes que morrerem durante o ensaio, por exame macroscópico das gónadas.

▼M7

Comportamento e aspeto

38. Registam-se todos os comportamentos anormais (relativamente aos peixes de controlo), nomeadamente sinais de toxicidade generalizada, como hiperventilação, natação descoordenada, perda de equilíbrio e alimentação ou inatividade atípicas. Registam-se igualmente as anomalias externas (tais como hemorragias e descoloração). Estes sinais de toxicidade devem ser cuidadosamente tidos em conta na interpretação dos dados, pois podem indiciar concentrações às quais os biomarcadores de atividade endócrina não são fiáveis. Estes exames comportamentais também podem fornecer informações qualitativas úteis que permitam justificar futuramente determinadas exigências nos ensaios com peixes. Por exemplo, em vairões-de-cabeça-grande expostos a androgénios, observou-se agressividade territorial em machos normais e masculinização de fêmeas; em peixes-zebra expostos a estrogénios ou a antiandrogénios, verificou-se redução ou perturbação do comportamento de acasalamento e de desova característico após a alvorada.

39. Dado que a manipulação dos peixes pode modificar rapidamente determinadas características do aspeto dos mesmos (nomeadamente a cor), é importante que os exames qualitativos tenham lugar antes de os animais serem retirados do sistema de ensaio. A experiência recolhida até à data com vairões-de-cabeça-grande aponta para que alguns produtos químicos com atividade endócrina podem começar por induzir alterações das seguintes características externas: cor do corpo (clara ou escura), padrões de coloração (ocorrência de listas verticais) e forma do corpo (cabeça e região peitoral). Por conseguinte, o aspeto físico dos peixes deve ser examinado ao longo do ensaio e no termo do estudo.

Fecundidade

40. Devem ser efetuados registos quantitativos diários da desova por replicado, registando-se a produção diária de ovos por fêmea sobrevivente em cada replicado. Os ovos devem ser retirados diariamente das cubas de ensaio. A fim de propiciar aos peixes condições normais de desova, devem colocar-se substratos de desova nas cubas de ensaio dos vairões-de-cabeça-grande e dos peixes-zebra. Fornecem-se no apêndice 4 elementos pormenorizados sobre os substratos de desova recomendados para os peixes-zebra (apêndice 4A) e os vairões-de-cabeça-grande (apêndice 4B). No caso dos peixes-do-arroz-japoneses não se considera necessário um substrato de desova.

Eutanásia dos peixes

41. No 21.º dia, ou seja, no final da exposição, eutanasiam-se os peixes com quantidades adequadas de tricaína — solução 100-500 mg/l de metanossulfonato de tricaína (metacaína, MS-222, CAS 886-86-2), tamponada com solução 300 mg/l de $NaHCO_3$ (bicarbonato de sódio, CAS 144-55-8) –, para reduzir a irritação das mucosas. Em seguida, colhem-se amostras de sangue ou de tecidos para determinação da vitelogenina, como se explica no item correspondente.

Exame de caracteres sexuais secundários

42. Alguns produtos químicos com atividade endócrina podem induzir alterações em caracteres sexuais secundários especializados (número de tubérculos nupciais no vairão-de-cabeça-grande macho, processos papilares no peixe-do-arroz-japonês macho). Alguns produtos químicos com determinados modos de ação podem, nomeadamente, ser responsáveis pela ocorrência anormal de caracteres sexuais secundários em animais do sexo oposto. Por exemplo, agonistas dos recetores de androgénios, como a trembolona, a metiltestosterona e a di-hidro-testosterona, podem provocar o aparecimento de tubérculos nupciais pronunciados na fêmea do vairão-de-cabeça-grande ou de processos papilares na fêmea do peixe-do-arroz-japonês (11) (20) (21). Também há registo de que os agonistas dos recetores de estrogénios podem reduzir o número de tubérculos nupciais e o volume da massa adiposa dorsal situada na base da cabeça dos machos adultos de vairão-de-cabeça-grande (26) (27). Estes exames morfológicos macroscópicos podem fornecer informações qualitativas e quantitativas úteis que permitam justificar futuramente determinadas exigências nos ensaios

▼M7

com peixes. O número e a dimensão dos tubérculos nupciais no vairão-de-cabeça-grande e dos processos papilares no peixe-do-arroz-japonês podem ser imediatamente quantificados ou — o que é mais prático — sê-lo em espécimes conservados. Nos apêndices 5A e 5B recomendam-se procedimentos para a avaliação dos caracteres sexuais secundários, respetivamente do vairão-de-cabeça-grande e do peixe-do-arroz-japonês.

Vitelogenina (VTG)

43. Colhe-se uma amostra de sangue na artéria/veia caudal com um microtubo capilar heparinizado para determinação do hematócrito ou, em alternativa, por punção cardíaca com uma seringa. O volume de sangue colhido depende do tamanho do peixe e geralmente situa-se entre 5 µl e 60 µl por espécime no caso do vairão-de-cabeça-grande e entre 5 µl e 15 µl por espécime no caso do peixe-do-arroz-japonês. Separa-se o plasma do resto do sangue por centrifugação e armazena-se a – 80 °C com inibidores das proteases, até à determinação analítica da vitelogenina. Em alternativa, como fonte de tecidos para determinação da vitelogenina, pode utilizar-se o fígado, no caso do peixe-do-arroz-japonês, e homogeneizado da cabeça e da cauda, no caso do peixe-zebra (apêndice 6). A vitelogenina deve ser determinada por um método ELISA homólogo validado, utilizando anticorpos homólogos e um padrão homólogo de vitelogenina. Recomenda-se o recurso a um método que permita detetar níveis de vitelogenina da ordem de alguns nanogramas por mililitro de plasma (ou nanogramas por miligrama de tecido), correspondentes ao nível de fundo dos peixes machos não-expostos.

44. O controlo de qualidade da análise da vitelogenina assenta na utilização de padrões, brancos e, pelo menos, duplicados. É necessário realizar um ensaio do efeito da matriz (efeito da diluição da amostra) em cada método ELISA, a fim de determinar o fator de diluição mínimo das amostras. Cada placa utilizada num método ELISA para determinação da vitelogenina deve incluir as seguintes amostras de controlo da qualidade: pelo menos 6 padrões de calibração que cubram o intervalo das concentrações previstas de vitelogenina e, pelo menos, um branco de ligações inespecíficas (analisado em duplicado). A absorvência destes brancos deve ser inferior a 5 % da absorvência máxima dos padrões de calibração. Analisam-se, pelo menos, duas alíquotas (alvéolos duplicados) de cada diluição da amostra. Reanalisam-se os alvéolos duplicados cujos resultados difiram mais de 20 %.

45. O coeficiente de correlação (R^2) das curvas de calibração deve ser superior a 0,99. Todavia, uma correlação elevada não é, por si só, garantia suficiente de capacidade de previsão adequada da concentração em toda a gama de concentrações. Além da correlação suficientemente elevada da curva de calibração, é necessário que a concentração de cada padrão, calculada a partir da curva de calibração, se situe entre 70 % e 120 % da concentração nominal correspondente. Se as concentrações nominais evidenciarem uma tendência de afastamento da reta de regressão de calibração (por exemplo a baixas concentrações), pode ser necessário dividir a curva de calibração numa gama alta e numa gama baixa ou recorrer a um modelo não linear que se ajuste adequadamente aos dados de absorvência. Se a curva for dividida, é necessário que, em ambos os segmentos de reta, $R^2 > 0{,}99$.

46. Define-se «limite de deteção» como a concentração do padrão analítico de concentração mais baixa e «limite de quantificação» como a concentração do padrão analítico de concentração mais baixa, multiplicada pelo fator de diluição mais baixo.

47. Em cada dia em que se realizem determinações da vitelogenina, analisa-se uma amostra enriquecida com um padrão de referência interno (apêndice 7). Juntamente com os resultados de cada série de ensaios realizados no dia, indica-se no relatório a relação entre a concentração esperada e a concentração medida.

Exame histopatológico das gónadas

48. As autoridades reguladoras podem exigir um exame histopatológico das gónadas para estudo do órgão-alvo do eixo hipotálamo-hipófise-gónadas após a exposição ao produto químico. Para isso, procede-se à fixação das gónadas *in situ* ou após dissecação. Se for exigido exame histopatológico,

▼M7

pesquisar-se-ão reações endócrinas específicas nas gónadas aquando da avaliação da atividade endócrina do produto químico em estudo. As reações de diagnóstico compreendem, essencialmente, a presença de ovócitos testiculares, hiperplasia das células de Leydig, diminuição da formação de vitelo, aumento das espermatogónias e hiperplasia perifolicular. Outras lesões das gónadas, como atresia dos ovócitos, degenerescência testicular e alterações de estádios, podem ter causas diversas. O documento de orientações sobre histopatologia das gónadas em peixes descreve os procedimentos a seguir na dissecação, na fixação, no corte e no exame histopatológico das gónadas (22).

DADOS E RELATÓRIOS

Avaliação das reações dos biomarcadores por análise da variância (ANOVA)

49. A fim de identificar atividade potencial do produto químico em estudo, comparam-se as reações obtidas para os grupos expostos e para os grupos de controlo por meio de uma análise de variância (ANOVA). Caso se utilize uma cuba de controlo do solvente, é necessário efetuar, para cada parâmetro, um teste estatístico adequado de comparação entre a cuba de controlo da água de diluição e a cuba de controlo do solvente. A referência (28) [OCDE (2006c)] fornece orientações sobre o tratamento de análise estatística a dar aos dados relativos à cuba de controlo da água de diluição e à cuba de controlo do solvente. Os dados relativos às reações biológicas analisam-se e apresentam-se no relatório, separadamente, por sexo. Se as exigências dos métodos paramétricos não forem satisfeitas — distribuição não-normal (teste de Shapiro-Wilk, por exemplo) ou variância heterogénea (teste de Bartlett ou teste de Levene) –, deve equacionar-se a possibilidade de proceder a uma transformação dos dados, para homogeneizar as variâncias antes da análise de variância, ou de optar por uma análise de variância ponderada. Se a relação entre a dose fornecida e a reação obtida não for monótona, pode aplicar-se o teste (paramétrico) de Dunnett a múltiplas comparações par a par ou recorrer-se ao teste (não-paramétrico) de Mann-Whitney com ajustamento de Bonferroni. Se a relação entre a dose fornecida e a reação obtida for aproximadamente monótona, pode recorrer-se a outros testes estatísticos: por exemplo o teste de Jonckheere-Terpstra ou o teste de Williams. O fluxograma do apêndice 8 visa facilitar a escolha do teste estatístico mais adequado. O documento da OCDE sobre as abordagens atuais na análise estatística de dados de ecotoxicidade (28) contém informações complementares.

Relatório dos resultados do ensaio

50. Dados do estudo a fornecer:

Instalações nas quais se realizaram os ensaios:

— pessoal responsável e responsabilidades de cada um no estudo;

— competência técnica do laboratório, previamente demonstrada para uma gama de produtos químicos representativos.

Produto químico em estudo

— caracterização do produto químico;

— estado físico e propriedades físico-químicas relevantes;

— método e frequência de preparação das concentrações utilizadas no ensaio;

— informações sobre estabilidade e biodegradabilidade.

Solvente

— caracterização do solvente (natureza, concentração utilizada);

— justificação da escolha do solvente (se não for água).

▼**M7**

Animais utilizados no ensaio

— espécie e estirpe;

— fornecedor e instalações específicas do fornecedor;

— idade dos peixes no início do ensaio e estado reprodutivo ou estado de desova dos peixes;

— elementos relativos ao processo de aclimatação dos peixes;

— peso corporal dos peixes no início da exposição (determinado a partir de uma subamostra do lote de peixes).

Condições de realização do ensaio

— protocolo de ensaio utilizado (tipo de ensaio, taxa de carga, densidade de ocupação etc.);

— método de preparação das soluções de reserva e caudal;

— concentrações de ensaio nominais, concentrações das soluções utilizadas no ensaio (medidas semanalmente) e métodos analíticos para esse efeito, médias dos valores medidos nas cubas de ensaio e desvios-padrão correspondentes e elementos comprovativos de que as medições dizem respeito às concentrações reais do produto químico em solução;

— características da água de diluição (pH, dureza, alcalinidade, temperatura, concentração de oxigénio dissolvido, níveis de cloro residuais, carbono orgânico total, sólidos em suspensão e outras medições efetuadas);

— qualidade da água nas cubas de ensaio: pH, dureza, temperatura e concentração de oxigénio dissolvido;

— informações pormenorizadas sobre a alimentação dos peixes — por exemplo, tipo(s) e proveniência do alimento, quantidade e frequência do fornecimento de alimento e resultados das análises de contaminantes relevantes (por exemplo, bifenilos policlorados, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e pesticidas organoclorados), se disponíveis.

Resultados

— elementos comprovativos de que as cubas de controlo respeitaram os critérios de aceitação do ensaio;

— dados relativos à mortalidade ocorrida para cada concentração ensaiada e nas cubas de controlo;

— técnicas de análise estatística utilizadas, tratamento dos dados e justificação das técnicas;

— dados relativos ao exame biológico da morfologia macroscópica (incluindo caracteres sexuais secundários), à produção de ovos e à vitelogenina;

— resultados das análises dos dados, de preferência reunidos em quadros e sob a forma de gráficos;

— incidência de reações inabituais manifestadas pelos peixes e de efeitos visíveis do produto químico em estudo.

▼M7

ORIENTAÇÕES PARA INTERPRETAÇÃO E ACEITAÇÃO DOS RESULTADOS DO ENSAIO

51. Nesta secção reflete-se sobre a interpretação dos resultados obtidos no ensaio, em relação aos diversos parâmetros medidos. Se o produto químico em estudo parecer ter efeitos tóxicos manifestos ou influenciar o estado geral dos animais ensaiados, os resultados obtidos devem ser interpretados com precaução.

52. Ao escolher a gama de concentrações a utilizar num ensaio, não deve exceder-se a concentração máxima tolerada, a fim de possibilitar uma interpretação dos dados que tenha significado. Importa que, pelo menos, uma das concentrações de exposição não gere sinais de efeitos tóxicos. Os sintomas de doenças e os sinais de efeitos tóxicos devem ser cuidadosamente avaliados e descritos no relatório. Por exemplo, a produção de vitelogenina nas fêmeas também pode ser influenciada por toxicidade generalizada e por modos de ação tóxica não-endócrinos, caso da hepatotoxicidade. Porém, a interpretação dos efeitos pode ser facilitada por outros níveis de exposição, cujos efeitos não sejam perturbados por toxicidade sistémica.

53. Há vários aspetos a ponderar na aceitação dos resultados de um ensaio. Como orientação, os níveis de vitelogenina de machos e fêmeas nos grupos de controlo devem diferir entre si, pelo menos, de três ordens de grandeza, no caso do vairão-de-cabeça-grande e do peixe-zebra, e cerca de uma ordem de grandeza, no caso do peixe-do-arroz-japonês. Os relatórios de validação (1) (2) (3) (4) apresentam exemplos de valores determinados em grupos de controlo e grupos expostos. Se os machos de controlo apresentarem valores de vitelogenina elevados, podem ficar comprometidas a sensibilidade do ensaio e a capacidade de deteção de agonistas fracos de estrogénios. Se as fêmeas de controlo apresentarem valores de vitelogenina baixos, podem ficar comprometidas a sensibilidade do ensaio e a capacidade de deteção de inibidores da aromatase e de antagonistas de estrogénios. Estas orientações baseiam-se nos estudos de validação.

54. A quantificação da produção de ovos está sujeita a importantes variações (o coeficiente de variação pode ser de 20 % a 60 %), que diminuem a capacidade do ensaio de detetar reduções significativas da produção de ovos abaixo dos 70 %, à medida que o coeficiente de variação vai aumentando e se aproxima de 50 %. Se o coeficiente de variação for baixo (20-30 %), o ensaio terá representatividade estatística aceitável (80 %) para detetar decréscimos de 40-50 % na produção de ovos. A inclusão planeada de quatro replicados, por nível de exposição, no ensaio do vairão-de-cabeça-grande confere maior representatividade estatística ao parâmetro «fecundidade» comparativamente a um ensaio baseado em apenas dois replicados.

55. Se o laboratório nunca tiver realizado este ensaio ou se tiverem sido efetuadas alterações substanciais (mudança do fornecedor ou da estirpe dos peixes, por exemplo), é aconselhável realizar um estudo de competência técnica. Nesse caso, recomenda-se que o estudo abranja produtos químicos que cubram diversos modos de ação ou efeitos em vários dos parâmetros avaliados no ensaio. Na prática, incentiva-se cada laboratório a constituir um registo de dados históricos de controlo de machos e fêmeas e a realizar um ensaio de controlo positivo de um produto químico com atividade estrogénica (por exemplo: 17β-estradiol a 100 ng/l ou um agonista fraco conhecido) que aumente o nível de vitelogenina nos peixes machos, um ensaio de controlo positivo de um produto químico inibidor da aromatase (por exemplo: fadrozole ou procloraz a 300 µg/l) que diminua a vitelogenina nos peixes fêmeas e um ensaio de controlo positivo de um produto químico com atividade androgénica (por exemplo: 17β-trembolona a 5 µg/l) que induza caracteres sexuais secundários em fêmeas do vairão-de-cabeça-grande e do peixe-do-arroz-japonês. Para ajuizar da competência do laboratório, comparam-se os dados assim obtidos com os dados provenientes dos estudos de validação (1) (2) (3).

56. Em geral, na ausência de sinais de toxicidade generalizada, considera-se positivo um resultado obtido em medições de vitelogenina caso se verifique um aumento, com significância estatística, da vitelogenina nos machos ($p<0,05$) ou uma diminuição, com significância estatística, da vitelogenina

▼M7

nas fêmeas ($p<0,05$), pelo menos para a maior dose ensaiada, comparativamente ao grupo de controlo. Corrobora ainda um resultado positivo a demonstração de uma relação biologicamente plausível entre a dose e a curva de resposta às doses. Como já se referiu, a diminuição do nível de vitelogenina pode não ser de origem totalmente endócrina. Porém, um resultado positivo deve, geralmente, ser interpretado como prova de atividade endócrina *in vivo* e, normalmente, deve dar lugar a uma pesquisa mais aprofundada.

57. As autoridades reguladoras podem exigir um exame histopatológico das gónadas para determinar a aptidão reprodutiva dos animais ensaiados e avaliar os resultados do ensaio com base no princípio da ponderação da suficiência da prova. Pode não ser necessário um exame histopatológico das gónadas se o resultado for positivo para o parâmetro vitelogenina ou o parâmetro caracteres sexuais secundários (isto é, aumento ou diminuição da vitelogenina ou indução de caracteres sexuais secundários).

REFERÊNCIAS

1) OCDE (2006a). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1A). OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, No. 60. Paris.

2) OCDE (2006b). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1B). OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, No. 61. Paris.

3) OCDE (2007). Final report of the Validation of the 21-day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine Active Substances. Phase 2: Testing Negative Substances. OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, No. 78. Paris.

4) Owens, J.W. (2007). Phase 3 report of the validation of the OECD Fish Screening Assay. CEFIC LRI Project, Endocrine (http://www.cefic-lri.org/index.php?page=projects — acesso em 18/9/2008).

5) US EPA (2007). Validation of the Fish Short-Term Reproduction Assay: Integrated Summary Report. 15 de dezembro de 2007. US Environmental Protection Agency, Duluth, Minnesota (104 pp.).

6) OCDE (2008). Report of the Validation Peer Review for the 21-Day Fish Endocrine Screening Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, No. 94. Paris.

7) Sumpter, J.P., Jobling, S. (1995). Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environmental Health Perspectives*, 103, Suppl. 7:173-8, review.

8) Pawlowski, S., *et al.* (2004). Androgenic and estrogenic effects of the synthetic androgen 17alpha-methyltestosterone on sexual development and reproductive performance in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) determined using the gonadal recrudescence assay. *Aquatic Toxicology*, 68(3):277-91.

9) Andersen, L., *et al.* (2006). Short-term exposure to low concentrations of the synthetic androgen methyltestosterone affects vitellogenin and steroid levels in adult male zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*, 76(3-4):343-52.

10) Ankley, G.T., *et al.* (2002). Evaluation of the aromatase inhibitor fadrozole in a short-term reproduction assay with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Toxicological Sciences*, 67(1):121-30.

▼M7

11) Panter, G.H., *et al.* (2004). Successful detection of (anti-)androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (*Pimephales promelas*) using easily measured endpoints of sexual development. *Aquatic Toxicology*, 70(1):11-21.

12) Parks, L.G., *et al.* (1999). Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part C — Pharmacology, toxicology and endocrinology, 123(2):113-25.

13) Panter, G.H., *et al.* (1999). Application of an ELISA to quantify vitellogenin concentrations in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to endocrine disrupting chemicals. CEFIC-EMSG research report reference AQ001. CEFIC, Bruxelas, Bélgica.

14) Fenske, M., *et al.* (2001). Development and validation of a homologous zebrafish (*Danio rerio* Hamilton-Buchanan) vitellogenin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its application for studies on estrogenic chemicals. *Comp. Biochem. Phys.*, C, 129 (3): 217-232.

15) Holbech, H., *et al.* (2001). Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part C — Pharmacology, toxicology and endocrinology, 130:119-131.

16) Rose, J., *et al.* (2002). Vitellogenin induction by 17b-estradiol and 17a--ethinylestradiol in male zebrafish (*Danio rerio*). *Comp. Biochem. Physiol.*, C, 131:531-539.

17) Brion, F., *et al.* (2002). Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 21:1699-1708.

18) Yokota, H., *et al.* (2001). Development of an ELISA for determination of the hepatic vitellogenin in Medaka (*Oryzias latipes*). *Jpn. J. Environ. Toxicol.*, 4:87–98.

19) Tatarazako, N., *et al.* (2004). Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the Medaka. *Journal of Health Science*, 50:301-308.

20) Ankley, G.T., *et al.* (2003). Effects of the androgenic growth promoter 17--beta-trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22(6):1350-60.

21) Seki, M., *et al.* (2004). Fish full life-cycle testing for androgen methyltestosterone on medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(3):774-81.

22) OCDE (2010). Guidance Document on Fish Gonadal Histopathology. OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, No. 123. Paris.

23) OCDE (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, No. 23. Paris.

24) Hutchinson, T.H., *et al.* (2006a). Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. Review. *Aquatic Toxicology*, 76; pp. 69–92.

25) Hutchinson, T.H., *et al.* (2006b). Screening and testing for endocrine disruption in fish-biomarkers as «signposts,» not «traffic lights» in risk assessment. *Environmental Health Perspectives*, 114, Suppl. 1:106-14.

▼**M7**

26) Miles-Richardson, S.R., *et al.* (1999). Effects of waterborne exposure to 17b--estradiol on secondary sex characteristics and gonads of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Aquat. Toxicol.*, 47, 129-145.

27) Martinovic, D., *et al.* (2008). Characterization of reproductive toxicity of vinclozolin in the fathead minnow and co-treatment with an androgen to confirm an anti-androgenic mode of action. *Environ. Toxicol. Chem.*, 27, 478-488.

28) OCDE (2006c). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, No. 54. OCDE, Paris.

29) US EPA (2008). Peer-Review Results for the Fish Short-Term Reproduction Assay (30 de janeiro de 2008). US Environmental Protection Agency, Washington DC (110 pp.).

30) OCDE (2012). OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters. OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, No. 150. OCDE, Paris.

▼M7

Apêndice 1

ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

Produto químico: Substância ou mistura.

CV: Coeficiente de variação.

ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay): Ensaio de imunossorção com ligação enzimática.

Eixo HHG: Eixo hipotálamo-hipófise-gónadas.

Taxa de carga: Peso húmido de peixe por volume de água.

CMT: Concentração máxima tolerada; representa cerca de 10 % da CL_{50}.

Densidade de ocupação: Número de peixes por volume de água.

Produto químico em estudo: Qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado este método de ensaio.

VTG (vitelogenina): Fosfolipoglicoproteína precursora das proteínas do vitelo, que normalmente ocorre nas fêmeas sexualmente ativas de todas as espécies ovíparas.

▼M7

Apêndice 2

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DO ENSAIO DE DESPISTAGEM DE ATIVIDADE ENDÓCRINA EM PEIXES

1. Espécies recomendadas	Vairão-de-cabeça-grande (*Pimephales promelas*)	Peixe-do-arroz-japonês (*Oryzias latipes*)	Peixe-zebra (*Danio rerio*)
2. Tipo de ensaio	Fluxo contínuo	Fluxo contínuo	Fluxo contínuo
3. Temperatura da água	25 ± 2 °C	25 ± 2 C	26 ± 2 °C
4. Iluminação	Lâmpadas fluorescentes (espetro largo)	Lâmpadas fluorescentes (espetro largo)	Lâmpadas fluorescentes (espetro largo)
5. Intensidade luminosa	10-20 μE/m^2/s, 540-1 000 lux ou 50-100 ft-c (níveis ambientes no laboratório)	10-20 μE/m^2/s, 540--1 000 lux ou 50-100 ft-c (níveis ambientes no laboratório)	10-20 μE/m^2/s, 540-1 000 lux ou 50-100 ft-c (níveis ambientes no laboratório)
6. Fotoperíodo (as transições alvorada e crepúsculo não são consideradas necessárias e são facultativas)	16 horas de luz, seguidas de 8 horas de escuridão	12-16 horas de luz, seguidas de 12-8 horas de escuridão	12-16 horas de luz, seguidas de 12-8 horas de escuridão
7. Taxa de carga	< 5 g por litro	< 5 g por litro	< 5 g por litro
8. Volume de cada cuba	10 l (mínimo)	2 l (mínimo)	5 l (mínimo)
9. Volume de solução em cada cuba	8 l (mínimo)	1,5 l (mínimo)	4 l (mínimo)
10. Substituição total do volume de solução em cada cuba	Mínimo: 6 diárias	Mínimo: 5 diárias	Mínimo: 5 diárias
11. Idade dos organismos utilizados no ensaio	Ver o ponto 21.	Ver o ponto 21.	Ver o ponto 21.
12. Peso húmido aproximado de um peixe adulto (g)	Fêmeas: 1,5 ± 20 % Machos: 2,5 ± 20 %	Fêmeas: 0,35 ± 20 % Machos: 0,35 ± 20 %	Fêmeas: 0,65 ± 20 % Machos: 0,4 ± 20 %
13. Número de peixes por cuba	6 (2 machos e 4 fêmeas)	6 (3 machos e 3 fêmeas)	10 (5 machos e 5 fêmeas)
14. Número de concentrações de exposição	3 (mais as cubas de controlo adequadas)	3 (mais as cubas de controlo adequadas)	3 (mais as cubas de controlo adequadas)
15. Número de cubas por concentração de exposição	Mínimo 4	Mínimo 4	Mínimo 2
16. Número de peixes por concentração ensaiada	16 fêmeas adultas e 8 machos adultos (4 fêmeas e 2 machos em cada cuba replicada)	12 fêmeas adultas e 12 machos adultos (3 fêmeas e 3 machos em cada cuba replicada)	10 fêmeas adultas e 10 machos adultos (5 fêmeas e 5 machos em cada cuba replicada)
17. Alimentação	Artémias adultas ou náuplios de artémias, vivos ou congelados, duas ou três vezes por dia (*ad libitum*), alimento para peixes disponível no comércio ou uma combinação dos dois	Náuplios de artémias duas ou três vezes por dia (*ad libitum*), alimento para peixes disponível no comércio ou uma combinação dos dois	Náuplios de artémias duas ou três vezes por dia (*ad libitum*), alimento para peixes disponível no comércio ou uma combinação dos dois

▼M7

18. Arejamento	Nenhum, salvo se a concentração de oxigénio dissolvido descer abaixo de 60 % do valor da saturação com ar	Nenhum, salvo se a concentração de oxigénio dissolvido descer abaixo de 60 % do valor da saturação com ar	Nenhum, salvo se a concentração de oxigénio dissolvido descer abaixo de 60 % do valor da saturação com ar
19. Água de diluição	Água de superfície, de poço ou reconstituída, ou água da torneira desclorada, limpa	Água de superfície, de poço ou reconstituída, ou água da torneira desclorada, limpa	Água de superfície, de poço ou reconstituída, ou água da torneira desclorada, limpa
20. Período de pré-exposição	7-14 dias (recomendado)	7-14 dias (recomendado)	7-14 dias (recomendado)
21. Duração da exposição ao produto químico	21 dias	21 dias	21 dias
22. Parâmetros biológicos	— sobrevivência — comportamento — fecundidade — caracteres sexuais secundários — vitelogenina — histopatologia das gónadas (facultativo)	— sobrevivência — comportamento — fecundidade — caracteres sexuais secundários — vitelogenina — histopatologia das gónadas (facultativo)	— sobrevivência — comportamento — fecundidade — vitelogenina — histopatologia das gónadas (facultativo)
23. Aceitabilidade do ensaio	concentração de oxigénio dissolvido > 60 % do valor de saturação; temperatura média de 25 ± 2 °C; 90 % de peixes sobreviventes nas cubas de controlo; concentrações medidas no ensaio situadas num intervalo de ± 20 % relativamente à média dos valores medidos, para cada nível de exposição.	concentração de oxigénio dissolvido > 60 % do valor de saturação; temperatura média de 25 ± 2 °C; 90 % de peixes sobreviventes nas cubas de controlo; concentrações medidas no ensaio situadas num intervalo de ± 20 % relativamente à média dos valores medidos, para cada nível de exposição.	concentração de oxigénio dissolvido > 60 % do valor de saturação; temperatura média de 26 ± 2 °C; 90 % de peixes sobreviventes nas cubas de controlo; concentrações medidas no ensaio situadas num intervalo de ± 20 % relativamente à média dos valores medidos, para cada nível de exposição.

▼**M7**

Apêndice 3

ALGUMAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DE UMA ÁGUA DE DILUIÇÃO ACEITÁVEL

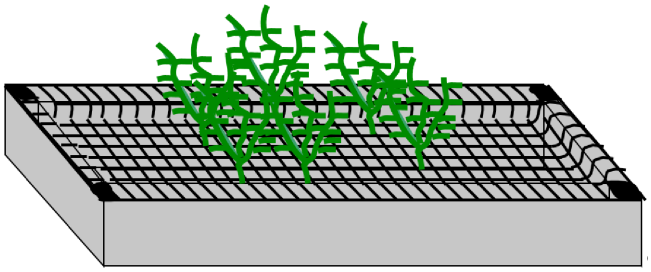
COMPONENTE	CONCENTRAÇÃO
Partículas	< 20 mg/l
Carbono orgânico total	< 2 mg/l
Amoníaco não-ionizado	< 1 µg/l
Cloro residual	< 10 µg/l
Pesticidas organofosforados totais	< 50 ng/l
Soma dos pesticidas organoclorados e dos bifenilos policlorados, totais	< 50 ng/l
Cloro orgânico total	< 25 ng/l

▼M7

Apêndice 4A

SUBSTRATO DE DESOVA PARA PEIXES-ZEBRA

Placa de desova: Tabuleiro de instrumentos totalmente em vidro — por exemplo com 22 cm de comprimento, 15 cm de largura e 5,5 cm de profundidade –, coberto com uma grelha amovível de arame de aço inoxidável (malha de 2 mm de largura). A base desta grelha de cobertura está a um nível inferior ao rebordo do tabuleiro.



Fixa-se um substrato de desova à grelha, de modo a formar uma estrutura na qual os peixes possam penetrar. São adequadas, por exemplo, plantas de aquário artificiais de plástico verde (nota: deve avaliar-se a possibilidade de adsorção do produto químico em estudo ao plástico). Mergulham-se previamente os elementos de plástico num volume de água tépida suficiente, durante tempo suficiente para que deles não passem produtos químicos para a água utilizada nos ensaios. Caso se utilizem objetos de vidro, os peixes não devem poder ferir-se neles nem ser por eles tolhidos nos seus movimentos vigorosos.

A distância entre a base desta placa e as paredes do tabuleiro de vidro não deve ser inferior a 3 cm, para que a desova não possa ocorrer fora dela. Os ovos postos sobre a placa atravessam a grelha e podem ser colhidos 45 a 60 minutos após o início da iluminação. Os ovos são transparentes e não-aderentes, podendo ser contados com facilidade utilizando luz lateral. Quando cada cuba alberga cinco fêmeas, pode considerar-se baixo um número diário de ovos até 20, médio entre 20 e 100 e alto se superior a 100. O mais tarde possível à noite ou de manhã muito cedo, retira-se a placa de desova, colhem-se os ovos e recoloca-se a placa na cuba de ensaio. A recolocação da placa na cuba não deve tardar mais de uma hora; caso contrário, o ressurgimento do substrato de desova pode induzir acasalamentos e desova fora de tempo. Se for inevitável recolocar a placa de desova mais tarde do que passada uma hora, a recolocação deve ocorrer pelo menos nove horas após o início da iluminação. A essa hora tardia do dia já não haverá indução de desova.

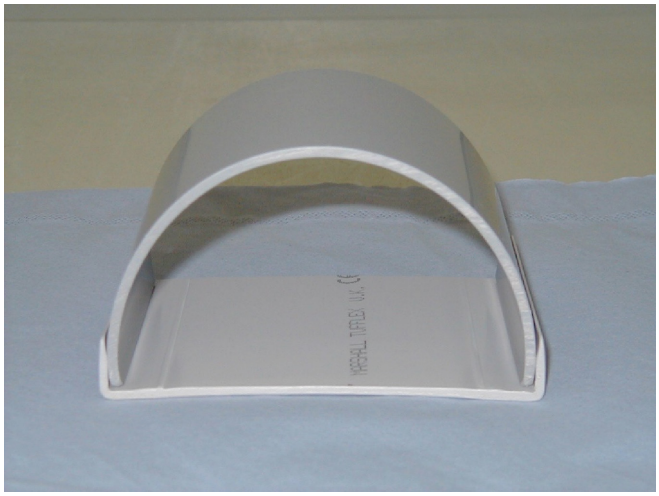
▼M7

Apêndice 4B

SUBSTRATO DE DESOVA PARA VAIRÕES-DE-CABEÇA-GRANDE

Colocam-se em cada cuba de ensaio duas ou três combinações de placa e cobertura de desova de plástico, cerâmica, vidro ou aço inoxidável (por exemplo, uma secção de caleira cinzenta com 80 mm de comprimento pousada numa placa de 130 mm de comprimento com rebordos — ver a fotografia). Verificou-se que coberturas de PVC ou cerâmicas adequadamente tratadas podem servir de substrato de desova (Thorpe *et al.*, 2007).

Recomenda-se que as coberturas sejam raspadas, para melhorar a aderência. A placa também deve ter uma proteção que impeça os peixes de alcançarem os ovos que caiam, a menos que se tenha demonstrado que os ovos aderem eficazmente ao substrato de desova utilizado.



A base destina-se a receber os ovos que, por não aderirem à superfície da cobertura, cairão no fundo da cuba (ou os ovos diretamente depositados na base plana de plástico do conjunto). Antes da utilização, mergulham-se os substratos de desova em água de diluição durante, pelo menos, 12 horas.

Thorpe, K.L., Benstead, R., Hutchinson, T.H., Tyler, C.R. (2007). An optimised experimental test procedure for measuring chemical effects on reproduction in the fathead minnow, *Pimephales promelas. Aquatic Toxicology*, 81, 90–98.

▼M7

Apêndice 5A

AVALIAÇÃO DE CARACTERES SEXUAIS SECUNDÁRIOS NO VAIRÃO-DE-CABEÇA-GRANDE PARA DETEÇÃO DE DETERMINADOS PRODUTOS QUÍMICOS COM ATIVIDADE ENDÓCRINA

Resumo

No vairão-de-cabeça-grande adulto, entre as características físicas que podem ter importância nos ensaios de desreguladores do sistema endócrino contam-se as seguintes: cor do corpo (clara ou escura), padrões de coloração (ocorrência ou ausência de listas verticais), forma do corpo (forma da cabeça e da região peitoral, distensão do abdómen) e caracteres sexuais secundários específicos (número e tamanho dos tubérculos nupciais, volume da massa adiposa dorsal e ovipositor)

No vairão-de-cabeça-grande, os tubérculos nupciais localizam-se na (massa adiposa dorsal da) cabeça dos machos reprodutores, em geral com simetria bilateral (Jensen *et al.*, 2001). Nas fêmeas de controlo e nos machos e fêmeas juvenis não se desenvolvem tubérculos (Jensen *et al.*, 2001). Podem existir até oito tubérculos distintos em volta dos olhos e entre as narinas dos machos. O maior número de tubérculos e os tubérculos maiores localizam-se em duas linhas paralelas imediatamente abaixo das narinas e acima da boca. Em muitos espécimes surgem grupos de tubérculos abaixo da mandíbula. O grupo mais próximo da boca é normalmente constituído por um só par, ao passo que o grupo em posição mais ventral pode compreender até quatro tubérculos. O número de tubérculos raramente excede 30 (intervalo: 18-28; Jensen *et al.*, 2001). Os tubérculos (numericamente) predominantes formam uma estrutura arredondada e a sua altura é aproximadamente igual ao raio. Na sua maior parte, os machos reprodutores também evidenciam, pelo menos, alguns tubérculos dilatados e salientes, não sendo possível individualizar a estrutura de cada tubérculo.

Alguns tipos de produtos químicos desreguladores do sistema endócrino podem provocar a ocorrência anormal de determinados caracteres sexuais secundários no sexo oposto. Por exemplo, agonistas dos recetores de androgénios, como a 17α-metiltestosterona ou a 17β-trembolona, podem provocar o aparecimento de tubérculos nupciais nas fêmeas de vairão-de-cabeça-grande (Smith, 1974; Ankley *et al.*, 2001, 2003) e os agonistas dos recetores de estrogénios podem reduzir o número ou a dimensão dos tubérculos nupciais nos machos (Miles-Richardson *et al.*, 1999; Harries *et al.*, 2000).

Segue-se uma descrição da caracterização dos tubérculos nupciais no vairão-de-cabeça-grande, com base no protocolo seguido pelo laboratório da Agência de Proteção do Ambiente, dos E.U.A. (Duluth, MN). Os produtos e equipamentos indicados podem ser substituídos por equivalentes disponíveis.

Para melhor visualização, pode utilizar-se uma lupa com iluminação ou um microscópio de dissecação com iluminação (3X). Examinam-se os peixes em posição dorsal, com a parte anterior para a frente (cabeça orientada para o observador).

— Coloca-se o peixe numa placa de Petri (por exemplo com 100 mm de diâmetro) com a parte anterior para a frente e o ventre para baixo. Foca-se o dispositivo ótico, a fim de identificar os tubérculos. Roda-se lateralmente o peixe, com cuidado, para identificar as zonas tuberculizadas. Contam-se e classificam-se os tubérculos.

— Repete-se o exame na parte ventral da cabeça, colocando o peixe na placa de Petri com a parte anterior para a frente e o dorso para baixo.

— O tempo necessário para examinar cada peixe é normalmente de 2 minutos.

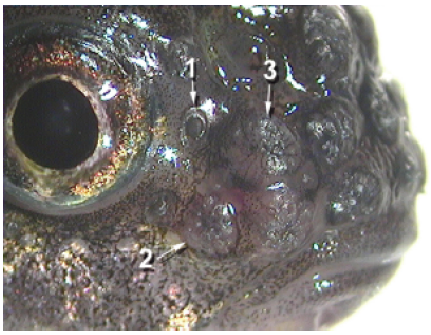
▼M7

Contagem e classificação dos tubérculos

Identificaram-se seis zonas específicas para avaliação da presença e do grau de desenvolvimento de tubérculos no vairão-de-cabeça-grande adulto. Para localizar e quantificar os tubérculos presentes criou-se a matriz apresentada no final deste apêndice. Regista-se o número de tubérculos e estabelece-se a seguinte classificação dimensional para cada organismo: 0-ausente, 1-presente, 2-dilatado, 3-saliente (figura 1).

Classe 0: ausente — nenhum tubérculo presente; classe 1: presente — tubérculo cuja altura é quase equivalente ao raio num ponto; classe 2: dilatado — tubérculo identificável por tecidos de aspeto semelhante a um asterisco, normalmente com uma base larga em todo o perímetro e estrias ou rugas a divergir do centro; em altura é muitas vezes mais irregular, mas o tubérculo também pode ser arredondado; classe 3: saliente — tubérculo normalmente bastante grande e arredondado, com estrutura menos definida; por vezes, os tubérculos deste tipo coalescem e formam uma massa única numa zona ou ocupando várias zonas (B, C e D na descrição *infra*); a cor e a forma dos tubérculos deste tipo são semelhantes às da classe 2, mas, por vezes, os tubérculos são difíceis de individualizar nesta base. Utilizando este sistema de classificação de tubérculos, normalmente a pontuação atribuída é inferior a 50, no caso de um macho de controlo normal com 18 a 20 tubérculos (Jensen *et al.*, 2001).

Figura 1



Em alguns peixes, o número de tubérculos numa determinada zona de classificação pode exceder as casas previstas na matriz. Se isso suceder, podem ser acrescentados números de classificação adicionais entre casas ou à esquerda ou direita das casas. A matriz não tem, portanto, de ser simétrica. Outra técnica, para localização de tubérculos emparelhados ou que coalesçam na vertical no plano horizontal da boca, consiste em indicar, na mesma caixa, a classificação correspondente a cada tubérculo do par.

Regiões da localização:

A — Tubérculos situados em volta dos olhos. Localizados em volta do lado anterior do contorno dos olhos, indicam-se na matriz do lado dorsal para o lado ventral. É comum serem múltiplos nos machos maduros de controlo, não estão presentes nas fêmeas de controlo e geralmente ocorre um par (um tubérculo próximo de cada olho) ou um único tubérculo nas fêmeas expostas a androgénios.

B-Tubérculos situados entre as narinas (poros dos canais sensoriais). Ocorrem normalmente aos pares nos machos de controlo, com os níveis de desenvolvimento mais elevados — 2 (dilatado) ou 3 (saliente). Ausentes nas fêmeas de controlo, mas por vezes presentes e desenvolvidos em fêmeas expostas a androgénios.

C — Tubérculos situados em posição imediatamente anterior às narinas, paralelamente à boca. Nos machos maduros de controlo são geralmente dilatados ou salientes. Presentes ou dilatados em machos menos desenvolvidos e nas fêmeas expostas a androgénios.

▼M7

D — Tubérculos situados paralelamente, ao longo da linha definida pela boca. Nos machos de controlo, normalmente recebem uma classificação de desenvolvidos. Ausentes nas fêmeas de controlo, mas presentes nas fêmeas expostas a androgénios.

E — Tubérculos situados na mandíbula, perto da boca, normalmente pequenos e frequentemente aos pares. Variáveis nos machos de controlo e nos machos e fêmeas expostos.

F — Tubérculos situados em posição ventral relativamente à zona E. Geralmente pequenos e aos pares. Presentes nos machos de controlo e nas fêmeas expostas a androgénios.

REFERÊNCIAS

1) Ankley, G.T., Jensen, K.M., Kahl, M.D., Korte, J.J., Makynen, M.E. (2001). Description and evaluation of a short-term reproduction test with the fathead minnow *(Pimephales promelas). Environ. Toxicol. Chem.*, 20:1276-1290.

2) Ankley, G.T., Jensen, K.M., Makynen, E.A., Kahl, M.D., Korte, J.J., Hornung, M.W., Henry, T.R., Denny, J.S., Leino, R.L., Wilson, V.S., Cardon, M.C., Hartig, P.C., Gray, E.L. (2003). Effects of the androgenic growth promoter 17-β trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. *Environ. Toxicol. Chem.*, 22:1350-1360.

3) Harries, J.E., Runnalls, T., Hill, E., Harris, C.A., Maddix, S., Sumpter, J.P., Tyler, C.R. (2000). Development of a reproductive performance test for endocrine disrupting chemicals using pair-breeding fathead minnows *(Pimephales promelas)*. *Environ. Sci. Technol.*, 34:3003-3011.

4) Jensen, K.M., Korte, J.J., Kahl, M.D., Pasha, M.S., Ankley, G.T. (2001). Aspects of basic reproductive biology and endocrinology in the fathead minnow *(Pimephales promelas). Comp. Biochem. Physiol.*, C, 128:127-141.

5) Kahl, M.D., Jensen, K.M., Korte, J.J., Ankley, G.T. (2001). Effects of handling on endocrinology and reproductive performance of the fathead minnow. *J. Fish. Biol.*, 59:515-523.

6) Miles-Richardson, S.R., Kramer, V.J., Fitzgerald, S.D., Render, J.A., Yamini, B., Barbee, S.J., Giesy, J.P. (1999). Effects of waterborne exposure of 17--estradiol on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows *(Pimephales promelas). Aquat. Toxicol.*, 47:129-145.

7) Smith, R.J.F. (1974). Effects of 17α-methyltestosterone on the dorsal pad and tubercles of fathead minnows *(Pimephales promelas). Can. J. Zool.*, 52:1031-1038.

Matriz de localização de tubérculos:

Identificação _____

Data_____

Pontuação total _____

Pontuação

1-presente

2-dilatado

3-saliente

	A	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**						
	B	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**						
	C	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**
	D	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**
		E	**X1**	**X1**							
	F	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**						

▼M7

Apêndice 5B

AVALIAÇÃO DE CARACTERES SEXUAIS SECUNDÁRIOS NO PEIXE-DO-ARROZ-JAPONÊS PARA DETEÇÃO DE DETERMINADOS PRODUTOS QUÍMICOS COM ATIVIDADE ENDÓCRINA

Descreve-se a seguir o protocolo de medição dos processos papilares ([1]), que constituem os caracteres sexuais secundários do peixe-do-arroz-japonês (*Oryzias latipes*).

1) Após excisão do fígado (apêndice 6), coloca-se a carcaça num tubo cónico com 10 ml de formol a 10 %, tamponado a pH neutro (cabeça para cima, cauda para baixo). Se a gónada for fixada numa solução que não seja formol a 10 % tamponado a pH neutro, corta-se a carcaça transversalmente com uma lâmina, entre a região anterior da barbatana anal e o ânus, tendo o cuidado de não lesionar o gonóporo nem a gónada (figura 3). Coloca-se o lado da cabeça do corpo do peixe na solução fixadora, para conservar a gónada, e o lado da cauda em formol a 10 %, tamponado a pH neutro, como se referiu.

2) Depois de colocar o corpo do peixe em formol a 10 % tamponado a pH neutro, segura-se a região anterior da barbatana anal com uma pinça e estende-se a barbatana durante cerca de 30 segundos, para a manter aberta. A fim de não lesionar os processos papilares com a pinça, puxa-se a barbatana anal, segurando-a com a pinça numa extensão de alguns raios apenas da região anterior.

3) Após manter a barbatana anal aberta durante cerca de 30 segundos, guarda-se o corpo do peixe à temperatura ambiente em formol a 10 %, tamponado a pH neutro, até à medição dos processos papilares (a efetuar depois de um período de fixação mínimo de 24 horas).

Medição

1) Depois de fixar o corpo do peixe durante, pelo menos, 24 horas em formol a 10 %, tamponado a pH neutro, retira-se a carcaça do tubo cónico e enxuga-se o formol com papel de filtro ou com um toalhete de papel.

2) Coloca-se o peixe com o abdómen para cima e corta-se cuidadosamente a barbatana anal com uma pequena tesoura de dissecação (é preferível cortar a barbatana com uma pequena quantidade de pterigióforo).

3) Pega-se na barbatana anal assim cortada com uma pinça, segurando-a pela região anterior, e coloca-se numa lâmina de vidro com algumas gotas de água. Cobre-se a barbatana anal com uma lamela de vidro. Há que ter o cuidado de não lesionar os processos papilares ao pegar na barbatana anal com a pinça.

4) Contam-se os segmentos de raio com processos papilares, utilizando um microscópio biológico (vertical ou invertido) e um contador. Reconhece-se um processo papilar pela formação de um pequeno processo visível na margem posterior do segmento de raio. Inscreve-se o número de segmentos com processos papilares em cada raio de barbatana na folha de registo do ensaio

([1]) Os processos papilares, normalmente, só aparecem em machos adultos e localizam-se nos raios da barbatana anal, entre o segundo e o sétimo ou oitavo raios desta, a contar da sua extremidade posterior (figuras 1 e 2). Aparecem raramente no primeiro raio da barbatana anal, a contar da extremidade posterior desta. Este protocolo normalizado contempla igualmente a medição de processos localizados no primeiro raio da barbatana anal (neste protocolo, o número de ordem dos raios inicia-se na extremidade posterior desta barbatana).

▼M7

(por exemplo: primeiro raio: 0, segundo raio: 10, terceiro raio: 12 etc.) e depois a soma desses números na folha Excel correspondente a cada peixe. Se necessário, fotografa-se a barbatana anal e contam-se na fotografia os segmentos de raio que têm processos papilares.

5) Depois das contagens, coloca-se a barbatana anal no tubo cónico referido em 1 e guarda-se o tubo.

Figura 1

Diferenças entre os sexos na forma e no tamanho da barbatana anal. A: macho; B: fêmea. Oka, T. B. (1931). On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. *J. Fac. Sci.*, Universidade de Tóquio, IV, 2:209-218.

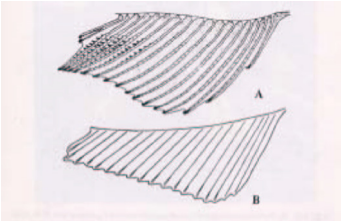


Figura 2

A: processos em segmentos de raios de barbatana anal; J.P.: segmento de raio; A.S.: espaço axial; P.: processo; B: extremidade distal do raio de barbatana. As actinotríquias (Act.) estão assinaladas na extremidade. Oka, T. B. (1931). On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. *J. Fac. Sci.*, Universidade de Tóquio, IV, 2:209-218.

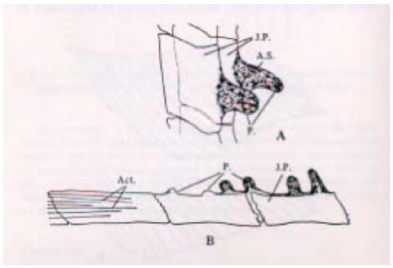
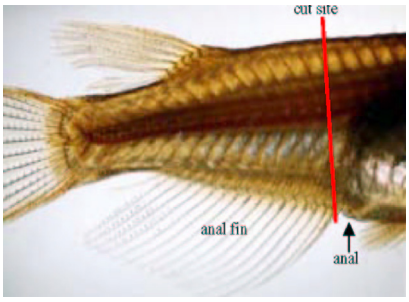


Figura 3

Fotografia do corpo de um peixe mostrando o sítio do corte a efetuar quando a gónada é fixada com uma solução que não seja formol a 10 % tamponado a pH neutro. Nesse caso, separa-se o resto do corpo por meio de um corte com uma lâmina, entre a região anterior da barbatana anal e o ânus (traço vermelho), após o que se coloca a parte do corpo do lado da cabeça na solução fixadora da gónada e a parte do corpo do lado da cauda em formol a 10 %, tamponado a pH neutro.



▼M7

Apêndice 6

PROTOCOLOS RECOMENDADOS PARA A COLHEITA DE AMOSTRAS DESTINADAS À ANÁLISE DA VITELOGENINA

É necessário tomar precauções para evitar contaminações cruzadas entre amostras de machos e fêmeas para determinação da vitelogenina.

Protocolo 1A: Colheita de sangue na artéria/veia caudal do vairão-de-cabeça-grande

Após anestesia, secciona-se parcialmente o pedúnculo caudal com um bisturi e recolhe-se sangue da veia/artéria caudal num microtubo capilar heparinizado para determinação do hematócrito. Depois de colhido o sangue, separa-se rapidamente o plasma por centrifugação durante 3 minutos a 15 000 *g* (ou, em alternativa, 15 000 *g* durante 10 minutos, a 4 °C). Caso se pretenda, pode determinar-se a percentagem de hematócrito depois da centrifugação. Transfere-se o plasma do microtubo capilar para um tubo de centrifugação que já contenha 0,13 unidades de aprotinina (um inibidor de proteases), conservando-o a – 80 °C até à determinação da vitelogenina. A quantidade de plasma depende do tamanho do vairão-de-cabeça-grande e este do sexo do peixe; o volume que pode ser colhido situa-se, em geral, entre 5 e 60 microlitros por peixe (Jensen *et al.*, 2001).

Protocolo 1B: Colheita de sangue no coração do vairão-de-cabeça-grande

Em alternativa, também pode colher-se sangue por punção cardíaca, utilizando uma seringa heparinizada (1000 unidades de heparina por mililitro). Transfere-se o sangue para tubos de Eppendorf (conservados em gelo) e centrifuga-se (7 000 *g* durante 5 minutos, à temperatura ambiente). Transfere-se o plasma para tubos de Eppendorf limpos (constituindo alíquotas, se o volume de plasma o permitir) e congela-se imediatamente a – 80 °C, até à realização das análises (Panter *et al.*, 1998).

Protocolo 2A: Excisão do fígado no peixe-do-arroz-japonês

Retirada dos peixes das cubas de ensaio

1) Retiram-se os peixes das cubas com um pequeno coador de rede, tendo o cuidado de não deixar cair nenhum peixe noutra cuba.

2) Em princípio, retiram-se os peixes pela ordem seguinte: cuba de controlo, cuba de controlo do solvente (se for o caso), cuba com a concentração mais baixa, cuba com a concentração intermédia, cuba com a concentração mais elevada e cuba de controlo positivo. Além disso, em cada cuba, retiram-se todos os machos antes de se retirarem as fêmeas.

3) Determina-se o sexo de cada peixe com base nos caracteres sexuais secundários externos (por exemplo a forma da barbatana caudal).

4) Coloca-se cada peixe num recipiente de transporte e leva-se para a bancada onde se procederá à excisão dos fígados. Verifica-se se a etiqueta aposta no recipiente de transporte é conforme com a etiqueta aposta na cuba de ensaio e confirma-se se o número de peixes removidos da cuba e o número de peixes que nela restam corresponde ao esperado.

5) Se não for possível determinar o sexo com base no aspeto físico dos peixes, retiram-se todos os peixes da cuba. Neste caso, determina-se o sexo por exame da gónada ou dos caracteres sexuais secundários ao microscópio estereoscópico.

Excisão do fígado

1) Utilizando o pequeno coador de rede, transferem-se os peixes do recipiente de transporte para a solução anestesiante.

▼M7

2) Uma vez os peixes anestesiados, transferem-se para um papel de filtro (ou para um toalhete de papel) com uma pinça de modelo normal. Ao pegar em cada peixe com a pinça, segura-se pela cabeça, para não lhe partir a cauda.

3) Enxuga-se a superfície do corpo do peixe com o papel de filtro (ou com o toalhete de papel).

4) Coloca-se o peixe com o abdómen para cima. Utilizando uma tesoura de dissecação, faz-se uma pequena incisão transversal na região ventral, entre a base da cabeça e a zona média do abdómen.

5) Insere-se a tesoura de dissecação nessa pequena incisão e faz-se outra incisão, ao longo da linha média do abdómen, entre um ponto caudal relativamente aos opérculos branquiais e o lado craniano do ânus. Não inserir a tesoura de dissecação demasiado profundamente, para não lesionar o fígado e a gónada.

6) Efetuam-se as operações seguintes, utilizando um microscópio estereoscópico.

7) Coloca-se o peixe com o abdómen para cima num toalhete de papel (podendo também ser numa placa de Petri de vidro ou numa lâmina de vidro).

8) Afastam-se as paredes da cavidade abdominal com pinças de precisão e expõem-se os órgãos internos. Se necessário, os órgãos internos também podem ser expostos mediante remoção de um dos lados da parede abdominal.

9) Utilizando outro par de pinças de precisão, expõe-se a zona de ligação do fígado e da vesícula biliar. Segura-se o canal biliar e faz-se um corte para separar a vesícula biliar, tendo o cuidado de não a romper.

10) Segura-se o esófago e separa-se do mesmo modo o aparelho digestivo do fígado, tendo o cuidado de não derramar o conteúdo daquele. Excisa-se do ânus a parte caudal do aparelho digestivo e retira-se o aparelho digestivo da cavidade abdominal.

11) Retira-se a massa adiposa e de outros tecidos que rodeiam o fígado, tendo o cuidado de não o lesionar.

12) Segura-se a zona portal hepática com pinças de precisão e retira-se o fígado da cavidade abdominal.

13) Coloca-se o fígado na lâmina de vidro. Utilizando pinças de precisão, retira-se da superfície do fígado o tecido adiposo e outro que ainda reste (por exemplo tecido da parede abdominal interna).

14) Pesa-se o fígado num microtubo de 1,5 ml previamente tarado, numa balança analítica eletrónica. Regista-se a leitura na folha de registo do ensaio (aproximação de 0,1 mg). Confirmam-se as informações identificadoras no rótulo do microtubo.

15) Coloca-se a tampa no microtubo que contém o fígado e guarda-se o tubo num suporte refrigerador (ou num suporte gelado).

16) Após a excisão de cada fígado, limpam-se os instrumentos de dissecação ou substituem-se estes por instrumentos limpos.

▼M7

17) Retira-se do mesmo modo o fígado a todos os peixes guardados nos recipientes de transporte.

18) Uma vez efetuada a excisão do fígado a todos os peixes guardados nos recipientes de transporte (ou seja, a todos os machos ou fêmeas de uma cuba), colocam-se os espécimes hepáticos num suporte de tubos, com uma etiqueta de identificação, e guardam-se no congelador. Se os fígados prosseguirem para o pré-tratamento pouco depois da excisão, levam-se os espécimes para a bancada correspondente num suporte refrigerador (ou num suporte gelado).

Após a excisão dos fígados, pode proceder-se à histologia das gónadas e à medição dos caracteres sexuais secundários nas carcaças.

Espécimes

Se não passarem ao pré-tratamento pouco depois da excisão, guardam-se os espécimes de fígado retirados dos peixes a uma temperatura ≤ – 70 °C.

Figura 1

Corte com tesoura em posição imediatamente anterior às barbatanas peitorais.

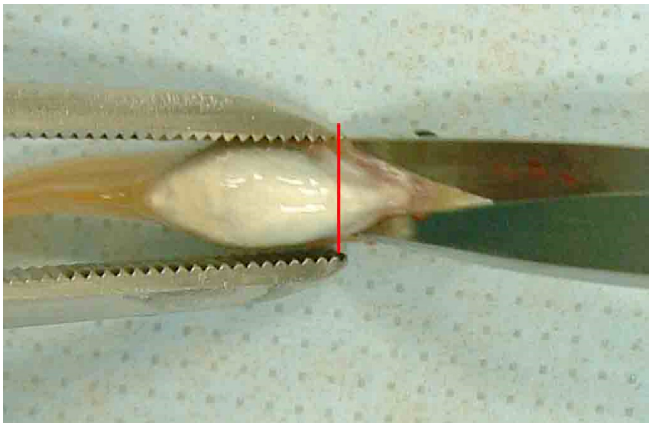
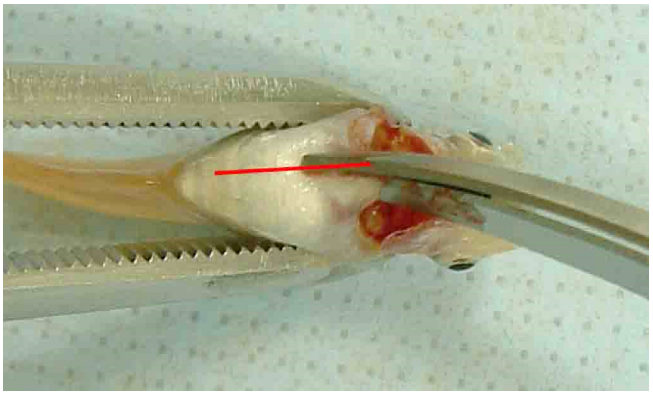


Figura 2

Incisão com tesoura ao longo da linha média abdominal, até um ponto cerca de 2 mm anterior ao ânus.



▼M7

Figura 3

Afastamento das paredes abdominais com uma pinça, de modo a expor o fígado e outros órgãos internos.

(Em alternativa, as paredes abdominais também podem ser afastadas lateralmente e ser mantidas nessa posição com alfinetes.)

A seta indica o fígado.

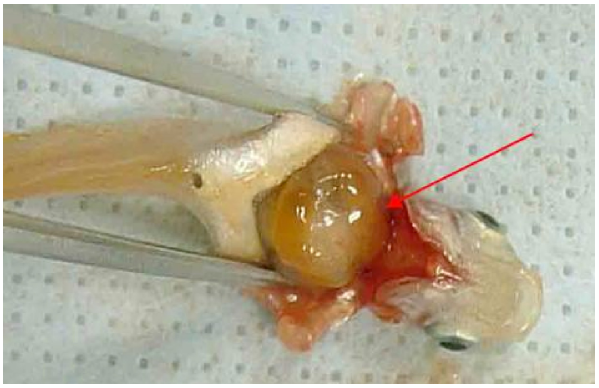


Figura 4

Dissecação e excisão do fígado com uma pinça, sem fazer cortes.

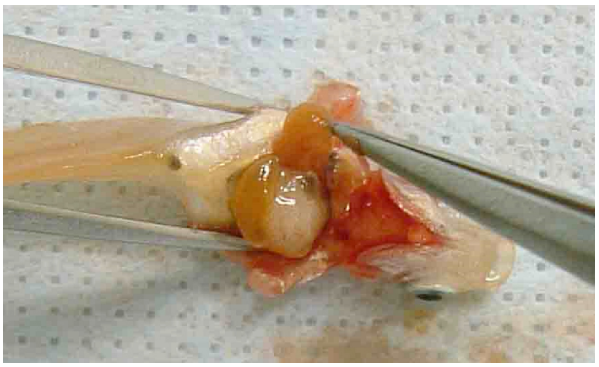
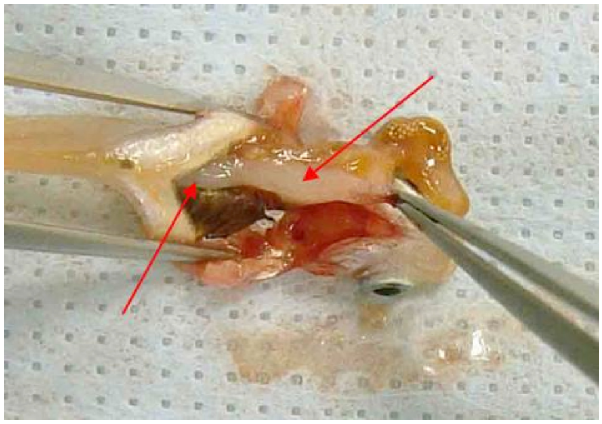


Figura 5

Retirada cuidadosa dos intestinos com uma pinça.



▼M7

Figura 6

Corte com tesoura das duas extremidades dos intestinos e das aderências do mesentério.

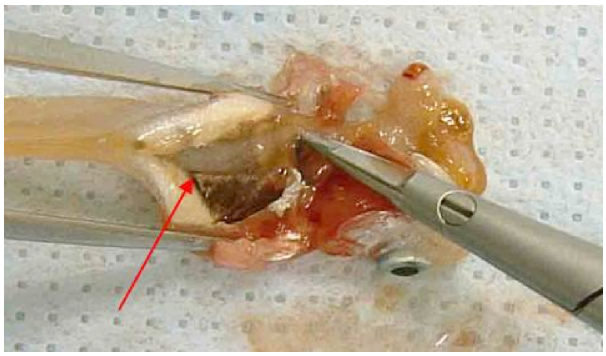


Figura 7 (fêmea)

O procedimento é idêntico para as fêmeas.

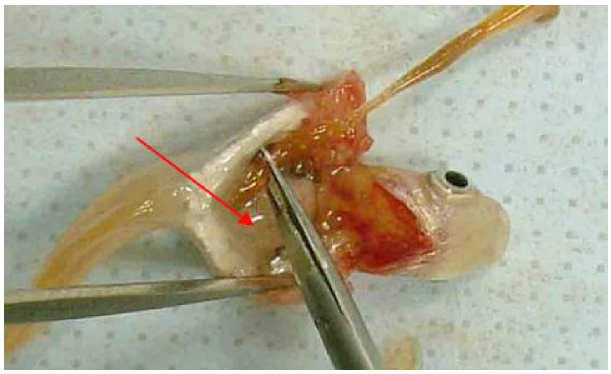
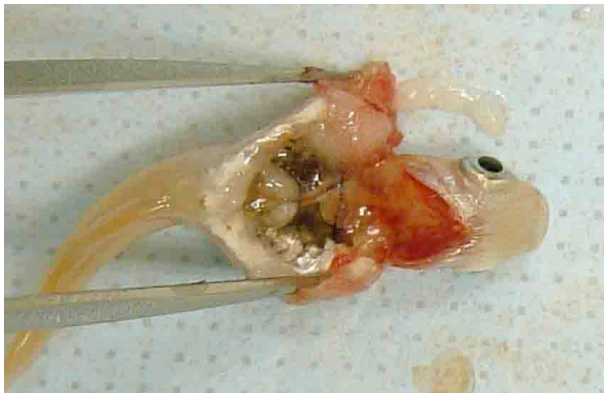


Figura 8

Procedimento concluído.



▼M7

Protocolo 2B: Pré-tratamento do fígado para análise da vitelogenina no peixe-do-arroz-japonês (*Oryzias latipes*)

Retira-se o frasco de tampão do homogeneizado do *kit* ELISA e refrigera em gelo moído (temperatura da solução: ≤ 4 °C). Caso se utilize tampão do homogeneizado do sistema ELISA da EnBio, deixa-se descongelar a solução à temperatura ambiente e depois refrigera-se o frasco em gelo moído.

Calcula-se o volume de tampão do homogeneizado para o fígado com base no peso deste (adicionam-se 50 µl de tampão do homogeneizado por miligrama de fígado). Por exemplo, se o fígado pesar 4,5 mg, utilizam-se para o efeito 225 µl de tampão do homogeneizado. Elabora-se uma lista com o volume de tampão do homogeneizado correspondente a cada fígado.

Preparação do fígado para o pré-tratamento

1) Imediatamente antes do pré-tratamento, retira-se do congelador o microtubo de 1,5 ml que contém o fígado.

2) Para evitar contaminações com vitelogenina, o pré-tratamento dos fígados dos machos deve preceder os das fêmeas. Além disso, procede-se ao pré-tratamento dos vários grupos ensaiados pela ordem seguinte: cuba de controlo, cuba de controlo do solvente (se for o caso), cuba com a concentração mais baixa, cuba com a concentração intermédia, cuba com a concentração mais elevada e cuba de controlo positivo.

3) O número de microtubos de 1,5 ml com amostras de fígado retirados do congelador numa dada ocasião não pode exceder o número de tubos que podem ser centrifugados de imediato.

4) Colocam-se os microtubos de 1,5 ml com as amostras de fígado no suporte gelado, por ordem de numeração dos espécimes (não é necessário descongelar o fígado).

Pré-tratamento

1) Adição do tampão do homogeneizado

   Verifica-se na lista o volume de tampão do homogeneizado a utilizar para a amostra de fígado e regula-se a micropipeta (100-1 000 µl) no volume adequado. Coloca-se uma ponta limpa na micropipeta.

   Retira-se tampão do homogeneizado do frasco onde está guardado e adiciona-se ao microtubo de 1,5 ml que contém a amostra de fígado.

   Procedendo do mesmo modo, adiciona-se tampão do homogeneizado a todos os microtubos de 1,5 ml que contêm as amostras de fígado. Não é necessário substituir a ponta da micropipeta, a menos que fique contaminada ou disso se suspeite.

2) Homogeneização do fígado

   — Fixa-se um novo pilão de homogeneização no homogeneizador do microtubo.

   — Insere-se o pilão no microtubo de 1,5 ml. Segura-se o homogeneizador do microtubo e comprime-se o fígado entre a superfície do pilão e a parede interna do microtubo.

   — Faz-se funcionar o homogeneizador do microtubo durante 10 a 20 segundos. Durante esta operação, mantém-se o microtubo de 1,5 ml refrigerado em gelo moído.

▼M7

— Retira-se o pilão do microtubo e deixa-se este em repouso durante cerca de 10 segundos. Em seguida, avalia-se visualmente o estado da suspensão.

— Caso se detetem fragmentos de fígado na suspensão, repetem-se as operações 3 e 4 para obter um homogeneizado de fígado satisfatório.

— Mantém-se a suspensão de homogeneizado de fígado no suporte gelado até à centrifugação.

— É necessário utilizar um pilão novo para cada homogeneizado.

— Homogeneizam-se todos os fígados com tampão do homogeneizado conforme se descreveu.

3) Centrifugação da suspensão de homogeneizado hepático

— Confirma-se que a temperatura da câmara de centrifugação refrigerada é ≤ 5 °C.

— Introduzem-se os microtubos de 1,5 ml com a suspensão de homogeneizado hepático na câmara de centrifugação refrigerada (se necessário, reequilibra-se).

— Centrifuga-se a suspensão de homogeneizado hepático a 13 000 *g* durante 10 minutos, a uma temperatura ≤ 5 °C. Se os sobrenadantes se separarem convenientemente, a força centrífuga e o tempo de centrifugação podem, se necessário, ser ajustados.

— Após a centrifugação, verifica-se se os sobrenadantes se separaram convenientemente (superfície: lípidos; camada intermédia: sobrenadante; camada inferior: tecido hepático). Se a separação não for adequada, procede-se a nova centrifugação da suspensão nas mesmas condições.

— Retiram-se todos os espécimes da câmara de centrifugação refrigerada e dispõem-se no suporte gelado por ordem de numeração dos espécimes. Há que ter cuidado para, depois da centrifugação, não ressuspender as camadas separadas.

4) Recolha do sobrenadante

— Colocam-se num suporte de tubos quatro microtubos de 0,5 ml para recolha de sobrenadante.

— Utilizando a micropipeta, retiram-se 30 µl de um dos sobrenadantes (fase intermédia separada) e transferem-se para um dos microtubos de 0,5 ml. Há que ter cuidado para não recolher lípidos da camada superior nem tecido hepático da camada inferior.

— Procedendo do modo descrito, transfere-se mais sobrenadante para dois outros microtubos de 0,5 ml.

— Recolhe-se o resto do sobrenadante com a micropipeta (se possível, ≥ 100 µl) e transfere-se para o último microtubo de 0,5 ml. Há que ter cuidado para não recolher lípidos da camada superior nem tecido hepático da camada inferior.

— Tapam-se os microtubos de 0,5 ml e escreve-se o volume de sobrenadante no rótulo respetivo. Refrigeram-se imediatamente os microtubos no suporte gelado.

— Substitui-se a ponta da micropipeta para cada sobrenadante. Caso fique agarrada à ponta da micropipeta uma grande quantidade de lípidos, substitui-se imediatamente a ponta, para evitar a contaminação do extrato de fígado com gorduras.

▼M7

— Transfere-se todo o sobrenadante centrifugado para quatro microtubos de 0,5 ml, conforme se descreveu.

— Uma vez transferido todo o sobrenadante, colocam-se os microtubos de 0,5 ml, com rótulo identificador, num suporte de tubos, que vai imediatamente para o congelador. Se a determinação das concentrações de vitelogenina decorrer logo a seguir ao pré-tratamento, coloca-se um dos microtubos de 0,5 ml (com 30 µl de sobrenadante) num suporte de tubos refrigerado e leva-se esse microtubo para a bancada onde irá realizar-se o ensaio ELISA. Nesse caso, colocam-se os outros microtubos noutro suporte de tubos, que vai para o congelador.

— Uma vez recolhido o sobrenadante, eliminam-se adequadamente os resíduos.

Conservação dos espécimes

Até serem utilizados no método ELISA, conservam-se os microtubos de 0,5 ml que contêm o sobrenadante do homogeneizado hepático a uma temperatura ≤– 70 °C.

Protocolo 3A: Colheita de sangue na artéria/veia caudal do peixe-zebra

Imediatamente após a anestesia, corta-se transversalmente o pedúnculo caudal e colhe-se sangue da artéria/veia caudal para um microtubo capilar heparinizado para determinação do hematócrito. O volume de sangue depende do tamanho do peixe, variando entre 5 e 15 µl. Adiciona-se ao microtubo capilar volume idêntico de tampão aprotinina (6 µg/ml em tampão fosfato, PBS) e separa-se o plasma do sangue por centrifugação (5 minutos a 600 *g*). Transfere-se o plasma para tubos de ensaio, que se conservam a – 20 °C até à determinação analítica da vitelogenina ou de outras proteínas relevantes.

Protocolo 3B: Colheita de sangue por punção cardíaca no peixe-zebra

Para evitar a coagulação do sangue e a degradação proteica, colhem-se as amostras numa solução de tampão fosfato (PBS) com 1 000 unidades de heparina por mililitro e 2 TIU (unidades de inibidor da tripsina) por mililitro do inibidor das proteases aprotinina. Recomenda-se a utilização de heparina (sal de amónio) e de aprotinina liofilizada, como ingredientes do tampão. Para colher as amostras, recomenda-se a utilização de seringas (de 1 ml) com agulha fina fixa (por exemplo Braun Omnikan-F). Enchem-se previamente as seringas com tampão (aproximadamente 100 µl), para eluir completamente os pequenos volumes de sangue colhidos em cada peixe. Colhem-se as amostras de sangue por punção cardíaca. Começa-se por anestesiar o peixe com MS-222 (100 mg/l). Um plano de anestesia correto permitirá ao utilizador distinguir o batimento cardíaco do peixe-zebra. Ao efetuar a punção cardíaca, a depressão exercida pelo pistão da seringa deve ser ligeira. O volume de sangue que pode ser recolhido situa-se entre 20 e 40 microlitros. Após a punção cardíaca, transfere-se a mistura de sangue e tampão para um tubo de ensaio. Separa-se o plasma do resto do sangue por centrifugação (20 minutos a 5 000 *g*) e conserva-se o plasma a – 80 °C até às análises.

Protocolo 3C: Procedimento normalizado de homogeneização da cabeça e da cauda do peixe-zebra

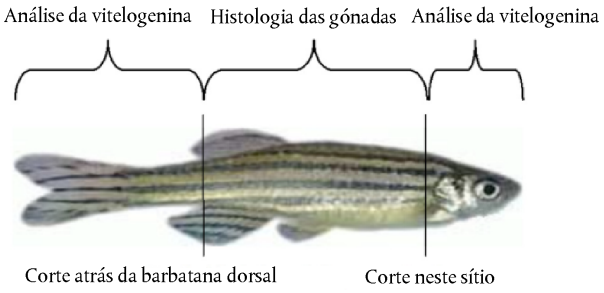
1. Anestesia-se e eutanasia-se cada peixe conforme consta da descrição do ensaio.

2. Cortam-se a cabeça e a cauda de cada peixe como ilustrado na figura 1.

Importante: *Para evitar que machos não-induzidos sejam contaminados por vitelogenina proveniente de fêmeas ou de machos induzidos, é necessário lavar e limpar corretamente (por exemplo com etanol a 96 %) os instrumentos de dissecação e a placa de corte, antes de passar ao peixe seguinte.*

▼**M7**

Figura 1



3. Pesa-se com aproximação de 1 mg o conjunto da cabeça e da cauda de cada peixe.

4. Após a pesagem, colocam-se ambas as partes em tubos adequados (por exemplo tubos de Eppendorf de 1,5 ml) e congela-se a – 80 °C, até à homogeneização, ou procede-se a homogeneização imediata sobre gelo com dois pilões de plástico. (Podem ser utilizados outros métodos, se se realizarem sobre gelo e deles resultar uma massa homogénea). Importante: *É necessário numerar corretamente os tubos, a fim de que a cabeça e a cauda de cada peixe possam ser relacionadas com o resto do corpo correspondente, utilizado na histologia das gónadas.*

5. Uma vez homogeneizada a massa, adiciona-se uma quantidade de **tampão de homogeneização** ([1]) gelado, correspondente a quatro vezes o peso dos tecidos. A mistura deve continuar a ser homogeneizada com os pilões até o estar completamente. Nota importante: *É necessário utilizar pilões novos para cada peixe.*

6. Colocam-se as amostras em gelo até à centrifugação a **4 °C**, durante 30 minutos, a 50 000 *g*.

7. Por meio de uma pipeta, transferem-se volumes de 20 µl do sobrenadante para, **pelo menos, dois** tubos, mergulhando para o efeito a ponta da pipeta através da camada superficial lipídica e aspirando cuidadosamente sobrenadante sem resíduos da fração lipídica nem da camada depositada.

8. Armazenam-se os tubos a – 80 °C até serem utilizados.

([1]) Tampão de homogeneização:
— (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4; 1 % da mistura de inibidores de proteases da Sigma): 12 ml de Tris-HCl, pH 7,4, + 120 µl da mistura de inibidores de proteases.
— TRIS: TRIS-ULTRAPURO (ICN), por exemplo da Bie & Berntsen, Dinamarca.
— Mistura de inibidores de proteases: da Sigma, para tecidos de mamíferos (n.º de produto P8340).
NOTA: O tampão de homogeneização tem de ser utilizado no próprio dia de preparação e de ser mantido em gelo durante esse período.

▼M7

Apêndice 7

AMOSTRAS ENRIQUECIDAS COM VITELOGENINA E PADRÃO DE REFERÊNCIA INTERNO

Em cada dia em que se realizem determinações da vitelogenina, analisa-se uma amostra enriquecida com um padrão de referência interno. Na preparação do padrão de referência interno, é necessário utilizar vitelogenina de um lote diferente do utilizado na preparação dos padrões de calibração para o ensaio em curso.

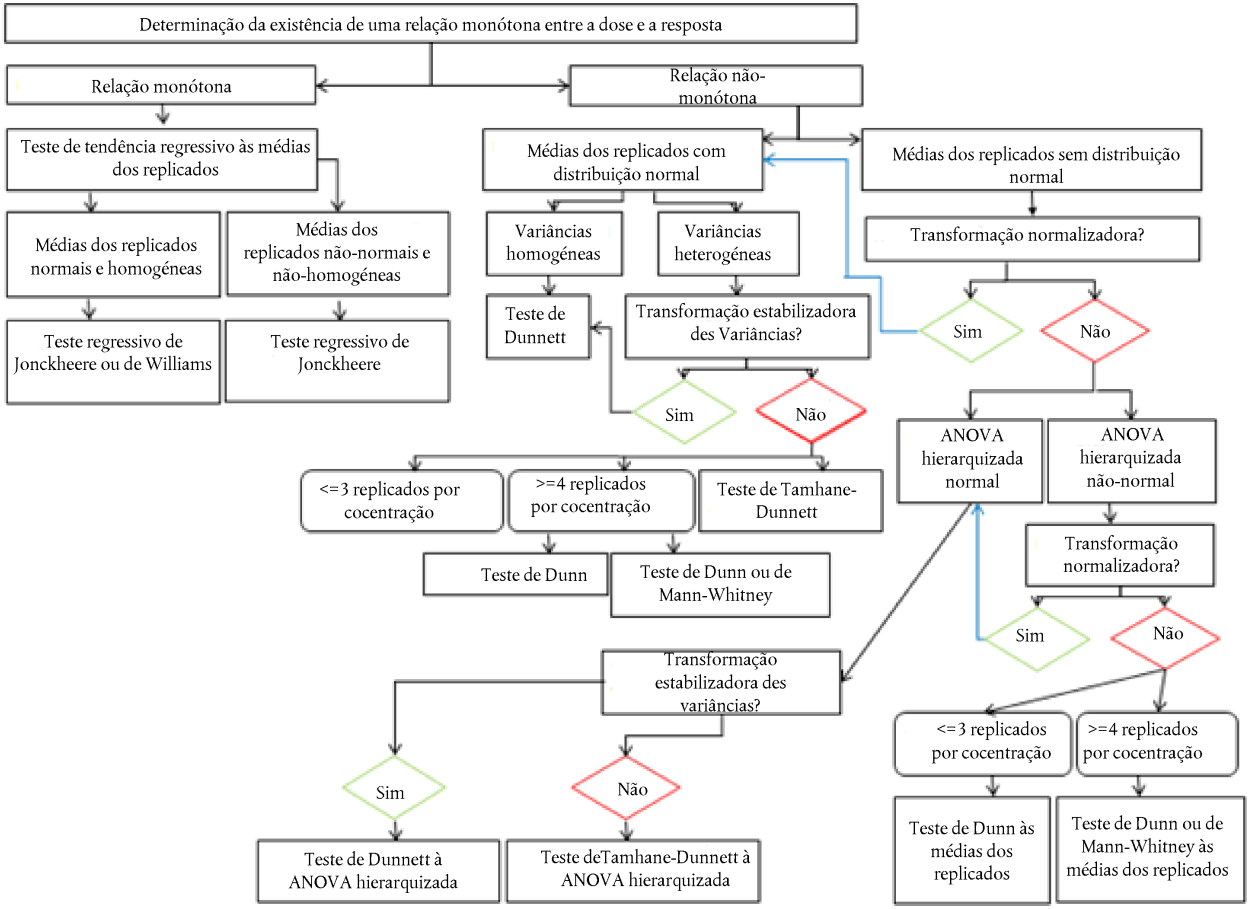
Prepara-se a amostra enriquecida adicionando uma quantidade conhecida do padrão interno a uma amostra de plasma de machos de controlo. Enriquece-se a amostra de modo a obter uma concentração de vitelogenina 10 a 100 vezes maior do que a concentração de vitelogenina esperada nos peixes machos de controlo. A amostra de plasma de machos de controlo a enriquecer pode provir de um só peixe ou ser composta a partir de vários peixes.

Analisa-se uma subamostra de plasma de machos de controlo não-enriquecido em, pelo menos, dois alvéolos duplicados. Analisa-se a amostra enriquecida igualmente em, pelo menos, dois alvéolos duplicados. A fim de determinar uma concentração esperada, adiciona-se a quantidade média de vitelogenina determinada nas duas amostras de plasma de machos de controlo não-enriquecido à quantidade (calculada) de vitelogenina adicionada para enriquecer as amostras. Juntamente com os resultados de cada série de ensaios realizados no dia, indica-se no relatório a relação entre esta concentração esperada e a concentração medida correspondente.

▼M7

Apêndice 8

FLUXOGRAMA DE DECISÃO PARA A ANÁLISE ESTATÍSTICA



▼M7

C.49. ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA EM EMBRIÕES DE PEIXES (FET)

INTRODUÇÃO

1. O presente método de ensaio é equivalente ao *Test Guideline* TG 236 (2013) da OCDE. Descreve um ensaio de toxicidade aguda em embriões de peixe (FET) com o peixe-zebra (*Danio rerio*). O ensaio é concebido para determinar a toxicidade aguda de produtos químicos em fases embrionárias de peixes. O ensaio FET baseia-se em estudos e atividades de validação com peixe-zebra (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14). Tem sido aplicado com êxito a uma vasta gama de produtos químicos com diferentes modos de ação, solubilidade, volatilidade e hidrofobicidade (revisto em 15 e 16).

2. No apêndice 1 definem-se alguns conceitos utilizados neste método de ensaio.

PRINCÍPIO DO ENSAIO

3. Ovos de peixe-zebra recentemente fertilizados são expostos ao produto químico de ensaio durante 96 horas. A cada 24 horas, até quatro observações apicais são registadas como indicadores de letalidade (6): (i) coagulação de ovos fertilizados, (ii) falta de formação dos somitos, (iii) falta de separação da cauda embrionária do saco vitelino, e (iv) ausência de batimentos cardíacos. No final do período de exposição, a toxicidade aguda é determinada com base num resultado positivo em qualquer uma das quatro observações apicais registadas, e é calculada a CL_{50}.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

4. As informações úteis sobre as propriedades específicas das substâncias são a fórmula estrutural, o peso molecular, o grau de pureza, a estabilidade em água e à luz, o pK_a, o K_{ow}, a solubilidade em água e a pressão de vapor, bem como os resultados de um ensaio de biodegradabilidade «fácil» (método de ensaio C.4 (17) ou C.29 (18)). A hidrossolubilidade e a pressão de vapor podem ser utilizadas para calcular a constante da Lei de Henry, o que permitirá verificar a ocorrência de perdas por evaporação da substância em estudo. Deve ser possível utilizar um método analítico fiável para a quantificação da substância nas soluções do ensaio, cuja exatidão e limite de deteção sejam conhecidos e se encontrem descritos.

5. Se o método de ensaio for utilizado para testar uma mistura, devem fornecer-se dados suficientes sobre a composição desta, nomeadamente a identidade química dos seus componentes, a ocorrência quantitativa destes e as suas propriedades específicas (ver ponto 4). Antes da utilização do método de ensaio para ensaios regulamentares de uma mistura, deve considerar-se se serão fornecidos resultados aceitáveis para efeitos de regulamentação.

6. No que diz respeito às substâncias que podem ser ativadas através do metabolismo, há provas de que os embriões de peixe-zebra possuem capacidades de biotransformação (19) (20) (21) (22). No entanto, a capacidade metabólica dos embriões de peixes nem sempre é semelhante à dos juvenis ou dos peixes adultos. Por exemplo, o álcool alílico protóxico (9) não foi respeitado pelo FTE. Por conseguinte, se existirem indicações de que metabolitos ou outros produtos de transformação podem ser mais tóxicos do que o composto parental, recomenda-se também a realização do ensaio com estes metabolitos/produtos de transformação e a utilização destes resultados nas conclusões sobre a toxicidade do produto químico em estudo ou, em alternativa, efetuar um novo ensaio que tenha em consideração o metabolismo.

7. Não é de prever que os embriões sejam sensíveis a substâncias de peso molecular ≥ 3kDa, de estrutura molecular muito volumosa ou que provocam atrasos na eclosão suscetíveis de evitar ou reduzir a exposição após a eclosão, devido a restrições de biodisponibilidade da substância, podendo ser mais adequados outros ensaios de toxicidade.

▼M7

VALIDADE DO ENSAIO

8. Para que os resultados do ensaio possam considerar-se válidos, têm de ser cumpridos os seguintes critérios:

a) A taxa de fertilização global de todos os ovos recolhidos deve ser ≥ 70 % no lote testado.

b) Em qualquer momento do ensaio, a temperatura da água nas câmaras de ensaio deve ser mantida a 26 ±1 °C.

c) A taxa de sobrevivência global de embriões no controlo negativo (água destilada), e, se for caso disso, no controlo do solvente, deve ser ≥ 90 % até ao final do período de 96 horas de exposição.

d) A exposição ao controlo positivo (por exemplo, 4,0 mg/l de 3,4-dicloroanilina para peixe-zebra) deverá ter como resultado um mínimo de 30 % de mortalidade no final do período de 96 horas de exposição.

e) A taxa de eclosão no controlo negativo (e controlo do solvente, se for caso disso) deve ser ≥ 80 % no final do período de 96 horas de exposição.

f) No final do período de 96 horas de exposição, a concentração de oxigénio dissolvido no controlo negativo e a concentração mais elevada do ensaio devem ser ≥ 80 % de saturação.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

9. O apêndice 2 apresenta uma panorâmica geral das recomendações de manutenção e condições do ensaio.

Material e aparelhagem

10. O seguinte equipamento é necessário:

a) Tanques de um material quimicamente inerte (vidro, por exemplo) e de capacidade adequada à carga e à densidade de ocupação recomendadas (ver «Manutenção de peixes reprodutores» apêndice 14);

b) Microscópio invertido e/ou binocular com capacidade de ampliação de, pelo menos, 80 vezes. Se a temperatura da sala de registo das observações não puder ser ajustada para 26 ±1 °C, é necessário recorrer a uma fase de temperatura controlada com circulação cruzada, ou a outros métodos, para manter a temperatura;

c) Câmaras de ensaio; p. ex., placas-padrão de 24 poços, com uma profundidade de aproximadamente 20 mm (ver «Câmaras de ensaio» n.º 11);

d) Por exemplo, películas autocolantes para cobrir as placas de 24 poços;

e) Incubadora ou sala climatizada com controlo de temperatura, que permita manter esta última a 26 ± 1 °C nos poços (ou câmaras de ensaio);

f) Medidor de pH;

g) Medidor de oxigénio:

h) Equipamento para a determinação da dureza da água e condutividade;

i) Placa de desova: tabuleiros de instrumentos de vidro, aço inoxidável ou de outras matérias inertes; malha de arame (dimensões da rede 2 ±0,5 mm) de aço inoxidável ou de outro material inerte para proteger os ovos uma vez postos; substrato de desova — por exemplo, plantas de imitação de material inerte — método de ensaio C.48, apêndice 4A (23);

j) Pipetas com aberturas alargadas para a recolha de ovos;

▼M7

k) Recipientes de vidro para preparar diferentes concentrações de ensaio e água de diluição (copos, balões volumétricos, provetas graduadas e pipetas graduadas) ou para recolher os ovos de peixe-zebra (por exemplo, copos, placas de cristalização);

l) Se forem utilizados sistemas de exposição alternativos, como o fluxo contínuo (24) ou a dosagem passiva (25), para a realização do ensaio, são necessárias instalações e equipamento adequados.

Câmaras de ensaio

11. Devem ser utilizadas câmaras de ensaio de vidro ou poliestireno (p. ex., placas de 24 poços, com uma capacidade de 2,5 a 5 ml por poço). Em caso de suspeita de adsorção ao poliestireno (p. ex., no caso de substâncias apolares, planas com elevada K_{ow}), devem utilizar-se materiais inertes (vidro) para reduzir as perdas por adsorção (26). As câmaras de ensaio devem ser posicionadas de forma aleatória na incubadora.

Água e condições de ensaio

12. Recomenda-se diluir a água de manutenção para alcançar níveis de dureza típicos de uma grande variedade de águas de superfície. A água de diluição deve ser preparada a partir de água reconstituída (27). O consequente grau de dureza deve ser equivalente a 100-300 mg/l $CaCO_3$, de modo a evitar a precipitação excessiva de carbonato de cálcio. Podem utilizar-se outras águas de superfície ou de poços, bem caracterizadas. A água reconstituída pode ser adaptada a água de manutenção de baixa dureza, por diluição com água desionizada até um rácio de 1:5 e uma dureza mínima de 30-35 mg/l $CaCO_3$. Antes da adição do produto químico em estudo, a água é arejada, até à saturação, com oxigénio. A temperatura nos poços deve ser mantida a 26 ± 1 °C, ao longo do ensaio. Durante o ensaio, o pH deve estar compreendido entre 6,5 e 8,5 e, nesse intervalo, não variar mais do que 1,5 unidades. Se o pH não se mantém neste intervalo, deve ser ajustado antes do início do ensaio. O ajustamento do pH deve ser efetuado de modo a não alterar de forma significativa a concentração da solução-padrão, nem causar qualquer reação química ou precipitação da substância em estudo. Recomenda-se a utilização de cloreto de hidrogénio (HCl) e de hidróxido de sódio (NaOH) para corrigir o pH nas soluções contendo o produto químico de ensaio.

Soluções utilizadas nos ensaios

13. As soluções utilizadas nos ensaios com as concentrações escolhidas podem ser preparadas, por exemplo, por diluição de uma solução-padrão. A solução-padrão deve ser preparada, preferencialmente, por simples mistura ou agitação da substância de ensaio na água de diluição, utilizando meios mecânicos (agitação e dispersão ultrassónica, por exemplo). Caso seja difícil dissolver o produto químico de ensaio em água, procede-se como é descrito no *Guidance Document* n.º 23 da OCDE, relativo à manipulação de substâncias e misturas difíceis (28). Deve evitar-se a utilização de solventes, embora estes possam ser necessários em alguns casos, para obter uma solução-padrão com a concentração adequada. Caso se utilize um solvente para facilitar a preparação de soluções-padrão, a sua concentração final não deve exceder 100 µl/l e deve ser a mesma em todos os recipientes de ensaio. Quando se utiliza um solvente, é necessário um controlo suplementar deste.

Manutenção dos peixes reprodutores

14. Para a produção de ovos, utiliza-se um lote de criação não exposto de peixe-zebra de tipo selvagem, com taxa de fertilização dos ovos bem documentada. Os peixes devem estar livres de sintomas macroscopicamente percetíveis de infeção e doença, e não devem ter sido submetidos a tratamentos farmacêuticos (agudos ou profiláticos) durante 2 meses antes da desova. Os

▼M7

peixes
reprodutores são mantidos em aquários com uma capacidade de carga recomendada de 1 l de água por peixe e um fotoperíodo fixo de 12-16 horas (29) (30) (31) (32) (33). Devem ajustar-se as taxas de filtragem otimizadas e evitar-se taxas de filtragem excessivas, que provocam elevados níveis de perturbação da água. Para as condições de alimentação, ver o apêndice 2. Deve evitar-se a alimentação excessiva; a limpeza e qualidade da água dos aquários deve ser controlada periodicamente e, se necessário, ser reinicializada para o estado inicial.

Ensaios de competência

15. O produto químico de referência, 3,4-dicloroanilina (utilizada nos estudos de validação (1) (2)), deve ser testada, de preferência, duas vezes por ano, num intervalo de concentração-resposta completo, para verificar a sensibilidade da estirpe de peixe utilizada. Os laboratórios que comecem a utilizar este ensaio devem utilizar os produtos químicos de referência. Um laboratório pode utilizar este produto químico para demonstrar a sua competência técnica na execução do ensaio antes de apresentar os resultados obtidos para efeitos de regulamentação.

Produção de ovos

16. Os ovos de peixe-zebra podem ser produzidos através de grupos de reprodutores (em tanques individuais de desova) ou por meio de desova massiva (em tanques de manutenção). No caso de grupos de reprodutores, colocam-se machos e fêmeas (p. ex., num rácio de 2:1), de um grupo de reprodução em tanques de desova algumas horas antes do início da fase escura do dia anterior ao ensaio. Uma vez que os grupos de reprodutores de peixe-zebra podem, ocasionalmente, não conseguir reproduzir-se, é recomendado utilizar-se paralelamente, pelo menos, três tanques de desova. Para evitar distorções estatísticas de cariz genético, os ovos são recolhidos de, pelo menos, três grupos de reprodução, misturados e selecionados aleatoriamente.

17. Para a recolha de ovos, são colocadas placas de desova em tanques de desova ou em tanques de manutenção antes da fase escura do dia anterior ao ensaio, ou antes do início da fase de luz no dia da realização do ensaio. Para impedir a predação de ovos pelos peixe-zebra adultos, as placas de desova são cobertas com rede de malhas de material inerte de dimensão adequada (aproximadamente 2 ± 0,5 mm). Se for considerado necessário, podem ser fixadas à rede plantas artificiais de material inerte (p. ex., plástico ou vidro), para estimular a reprodução (3) (4) (5) (23) (35). Devem utilizar-se materiais de plástico resistentes que não contaminem (p. ex., ftalatos). O acasalamento, a desova e a fertilização ocorrem num período de 30 minutos após o início da fase de luz; as placas de desova com os ovos recolhidos podem ser removidos com cuidado. A lavagem dos ovos com água reconstituída depois de estes terem sido recolhidos das placas de desova é recomendada.

Diferenciação dos ovos

18. A 26 °C, os ovos fertilizados passam pela primeira clivagem após cerca de 15 minutos e as clivagens sincronizadas consecutivas formam 4, 8, 16 e 32 células blastómeros (ver apêndice 3) (35). Nestas fases, os ovos fertilizados podem ser claramente identificados, através do desenvolvimento de uma blástula.

PROCEDIMENTO

Condições de exposição

19. Vinte embriões por concentração (um embrião por poço) são expostos ao produto químico de ensaio. A exposição deve ser feita de maneira a que ± 20 % da concentração nominal do produto químico seja mantida durante todo o ensaio. Se isso não for possível num sistema estático, deve utilizar-se um intervalo de renovação semiestático manejável (por exemplo, renovação a cada 24 horas). Nestes casos, importa verificar as concentrações de exposição, no mínimo, nos tratamentos com maior e menor concentração, no início e no final de cada período de exposição (ver ponto 36). Se não puder ser mantida uma concentração de exposição de ± 20 % da concentração nominal, todas as concentrações devem ser medidas no início e no final de cada período de exposição (ver ponto 36). No momento da renovação,

▼M7

é necessário tomar precauções para que os embriões continuem submersos por uma pequena quantidade de solução de ensaio usada, de forma a evitar a sua secagem. O planeamento do ensaio pode ser adaptado de forma a cumprir requisitos de ensaio de substâncias específicas — p. ex., fluxo contínuo (24) ou sistemas de dosagem passivas (25) para substâncias facilmente degradáveis ou altamente adsorvíeis (29), ou outros para substâncias voláteis (36) (37). Em qualquer caso, é necessário tomar precauções para reduzir ao mínimo o stress dos embriões. Antes do início do ensaio, as câmaras de ensaio devem ser acondicionadas durante, pelo menos, 24 horas com as soluções de ensaio. As condições de ensaio são resumidas no apêndice 2.

Concentrações de ensaio

20. Para cumprir os requisitos estatísticos são necessárias, normalmente, cinco concentrações da substância de ensaio espaçadas por um fator constante não superior a 2,2. Caso se utilizem menos de cinco concentrações, deve apresentar-se uma justificação. A concentração mais elevada do ensaio deveria resultar, de preferência, em 100 % de letalidade; por seu turno, a concentração mais baixa não ter efeitos observáveis, como definido no ponto 28. Um ensaio de determinação da gama de concentrações antes do ensaio definitivo permite selecionar a gama de concentrações adequada. A gama de concentrações geralmente utilizada é de dez embriões por concentração. As seguintes instruções referem-se à realização do ensaio em placas de 24 poços. Se forem utilizadas diferentes câmaras de ensaio (p. ex., placas de Petri pequenas) ou forem testadas mais concentrações, as instruções devem ser alteradas em conformidade.

21. O ponto 27 e o apêndice 4 contêm informações e instruções visuais para a atribuição das concentrações em placas de 24 poços.

Grupos de controlo

22. São necessários controlos de água de diluição, tanto como controlo negativo como controlo interno da placa. Se se observar mais de 1 embrião morto no controlo interno da placa, essa placa é rejeitada, reduzindo, assim, o número de concentrações utilizadas para determinar o valor de CL_{50}. Se uma placa inteira for rejeitada, a capacidade para avaliar e determinar os efeitos observados pode tornar-se mais difícil, especialmente se se tratar da placa de controlo do solvente ou de uma placa em que os embriões tratados também são afetados. No primeiro caso, o ensaio deve ser repetido. No segundo caso, a perda, na totalidade, de um ou mais grupos de tratamento devido à mortalidade no controlo interno pode limitar a capacidade para avaliar os efeitos e determinar os valores de CL_{50}.

23. Para cada lote de ovos utilizados no ensaio, é realizado um controlo positivo com uma concentração fixa de 4 mg/l de 3,4-dicloroanilina.

24. Caso se utilize um solvente, um grupo extra de 20 embriões é exposto ao mesmo numa placa à parte de 24 poços, servindo assim como amostra de controlo do solvente. Para considerar o ensaio aceitável, deve demonstrar-se que o solvente não têm efeitos significativos sobre o tempo de eclosão e sobrevivência, nem produz quaisquer outros efeitos nocivos sobre os embriões (ver ponto 8c).

Início da exposição e a duração do ensaio

25. O ensaio é iniciado o mais rapidamente possível após a fertilização dos ovos e terminado após as 96 horas de exposição. Os embriões devem ser imersos na solução de ensaio antes do início da clivagem do blastodisco ou, o mais tardar, na fase de 16 células. Para iniciar a exposição com atraso mínimo, é necessário, pelo menos, duplicar o número de ovos em cada grupo de tratamento, selecionando-os aleatoriamente e transferindo-os para as respetivas concentrações e controlos (por exemplo, em placas de cristalização de 100 ml; os ovos devem estar completamente submersos), o mais tardar, 90 minutos após a fertilização.

26. Os ovos fertilizados viáveis devem ser separados dos ovos não fertilizados e transferidos para placas de 24 poços pré-acondicionadas durante 24 horas e

▼M7

enchidas novamente com 2 ml de soluções de ensaio novas, no prazo de 180 minutos após a fertilização. Por estereomicroscopia (de preferência com ampliação ≥ 30 vezes), selecionam-se os ovos fertilizados num processo de clivagem, sem irregularidades visíveis durante a clivagem (por exemplo, assimetria, formação da vesícula) nem lesões no corión. Para a recolha e separação dos ovos, ver apêndice 3, figura 1 e 3 e apêndice 4, figura 2.

Distribuição dos ovos nas placas de 24 poços

27. Os ovos são distribuídos pelas placas nas seguintes quantidades (ver também o anexo 4, fig. 1)

— 20 ovos numa placa para cada concentração de ensaio;

— 20 ovos numa placa como controlo do solvente (se necessário);

— 20 ovos numa placa como controlo positivo;

— 4 ovos em água de diluição como controlo interno da placa em cada uma das placas anteriores;

— 24 ovos em água de diluição numa placa como controlo negativo.

Observações

28. As observações apicais realizadas em cada embrião testado incluem o seguinte: coagulação dos embriões, ausência de formação dos somitos, não separação da cauda e ausência de batimentos cardíacos (quadro 1). Estas observações são utilizadas para a determinação de letalidade: qualquer resultado positivo numa destas observações significa que o embrião de peixe-zebra está morto. Além disso, regista-se a eclosão diariamente nos grupos de tratamento e controlo a partir das 48 horas. As observações são registadas a cada 24 horas, até ao final do ensaio.

Quadro 1

Observações apicais da toxicidade aguda em embriões de peixe-zebra 24-96 horas após a fertilização.

	Tempos de exposição			
	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
Embriões coagulados	+	+	+	+
Ausência de formação dos somitos	+	+	+	+
Não separação da cauda	+	+	+	+
Ausência de batimentos cardíacos		+	+	+

29. *Coagulação do embrião:* Os embriões coagulados têm uma coloração branca leitosa e são escuros na visualização ao microscópico (ver apêndice 5, fig. 1). O número de embriões coagulados é determinado após 24, 48, 72 e 96 horas.

30. *Ausência de formação dos somitos:* A 26 ± 1 °C, formaram-se cerca de 20 somitos após 24 horas (ver apêndice 5, figura 2) em embriões de peixe-zebra com desenvolvimento normal. Um embrião normalmente desenvolvido exibe movimentos espontâneos (contrações lado a lado). Os movimentos espontâneos indicam a formação de somitos. A ausência de somitos é registada após 24, 48, 72 e 96 horas. A não formação de somitos pode dever-se a um atraso geral no desenvolvimento. O mais tardar até 48 horas, deverá observar-se a formação de somitos. Se não for o caso, os embriões são considerados mortos.

31. *Ausência de separação da cauda:* Em embriões de peixe-zebra com desenvolvimento normal, observa-se a separação da cauda (ver apêndice 5, figura

▼M7

3) a partir do saco vitelino após o último alongamento do embrião. A ausência de separação da cauda é registada após 24, 48, 72 e 96 horas.

32. *Ausência de batimentos cardíacos:* Em embriões de peixe-zebra com desenvolvimento normal a 26 ± 1 °C, os batimentos cardíacos são visíveis após 48 horas (ver apêndice 5, figura 4). Deve ter-se um cuidado especial quando se regista este parâmetro, uma vez que batimento cardíaco irregular (errático) não deve ser registado como letal. Além disso, batimento cardíaco visível sem circulação na aorta abdominal é considerado não-letal. Para registar este parâmetro, os embriões não apresentem batimento cardíaco devem ser observados numa ampliação mínima de 80 x durante, pelo menos, um minuto. A ausência de batimento cardíaco é registada após 48, 72 e 96 horas.

33. As taxas de incubação de todos os grupos de tratamentos e de controlo devem ser registadas a partir das 48 horas, e descritas no relatório. Embora a incubação não seja um parâmetro utilizado para o cálculo da CL_{50}, assegura a exposição do embrião sem uma potencial função de barreira do corión, e, como tal, pode auxiliar na interpretação dos resultados.

34. Os apêndices 3 e 5 contêm descrições pormenorizadas do desenvolvimento normal (35) e exemplos do desenvolvimento anormal de embriões de peixe-zebra.

Determinações analíticas

35. No início e no final do ensaio, medem-se o pH, a dureza total e a condutividade no(s) grupo(s) controlo(s) e na maior concentração do produto químico de ensaio. Em sistemas de renovação semiestático, o pH deve ser medido antes e depois da renovação da água. A concentração de oxigénio dissolvido é medida no final do ensaio nos controlos negativos e no tratamento com concentração de ensaio mais elevada com embriões viáveis, os quais devem ser conformes com os critérios de validade do ensaio (ver ponto 8, alínea f). Se houver a temperatura puder variar entre as placas de 24 poços, a dev ser medida em três recipientes selecionados aleatoriamente. Durante o ensaio, a temperatura deve ser registada, de preferência, continuamente ou, no mínimo, diariamente.

36. Num sistema estático, a concentração do produto químico de ensaio deve ser medida, no mínimo, nos tratamentos com maior e menor concentração, mas, de preferência, em todos os tratamentos, no início e no final do ensaio. Para os ensaios semiestáticos (de renovação), em que a concentração do produto químico de ensaio se deve manter no intervalo de ± 20 % dos valores nominais, recomenda-se que, no mínimo, a concentração de ensaio mais elevada e a menor sejam analisadas quando acabam de ser preparadas e imediatamente antes da renovação. Para os ensaios em que não é de prever que a concentração do produto químico em estudo se mantenha no intervalo de ± 20 % do valor nominal, é necessário analisar todas as concentrações de ensaio no momento em que as soluções acabam de ser preparadas e imediatamente antes da renovação. Em caso de volume insuficiente para análise, pode ser útil a fusão de soluções de ensaio ou a utilização de câmaras alternativas do mesmo material, com o mesmo rácio volume/superfície das placas de 24 poços. Recomenda-se vivamente que os resultados se baseiem nas concentrações medidas. Se as concentrações não se mantiverem no intervalo de 80-120 % da concentração nominal, as concentrações com efeitos devem ser expressas relativamente à média geométrica das concentrações medidas; para mais detalhes, ver o capítulo 5 do *Guidance Document* da OCDE *Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures* (28).

ENSAIO NO LIMITE

37. Pode efetuar-se, utilizando os procedimentos descritos no presente método de ensaio, um ensaio no limite com uma concentração de 100 mg/l do produto químico de ensaio, ou até ao respetivo limite de solubilidade no meio de ensaio (se este for inferior), a fim de demonstrar que a CL_{50} é

▼M7

superior àquela concentração. O ensaio no limite deverá utilizar 20 embriões no tratamento, no controlo positivo e — se necessário — no controlo do solvente, e 24 embriões no controlo negativo. Se a percentagem de letalidade na concentração testada for superior à mortalidade no controlo negativo (ou no controlo do solvente) em 10 %, deverá realizar-se um estudo completo. Devem regsitar-se quaisquer efeitos observados. Caso a mortalidade seja superior a 10 % no controlo negativo (ou no controlo do solvente), o ensaio não é válido e deve ser repetido.

RESULTADOS E RELATÓRIO

Tratamento dos resultados

38. Neste ensaio, cada poço é considerado uma réplica independente para análise estatística. As percentagens de embriões em que, pelo menos, uma das observações apicais é positiva às 48 e/ou à 96 horas são posteriormente representadas num gráfico, em função das concentrações testadas. Para o cálculo do declive da curva, os valores de CL_{50} e os limites de confiança (95 %), devem ser aplicados métodos estatísticos adequados (38) e consultado o *Guidance Document* da OCDE intitulado *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data* (39).

Relatório do ensaio

39. O relatório do ensaio deve incluir as seguintes informações:

Produto químico de ensaio:

Substância monocomponentes:

— aspeto físico, solubilidade em água e outras propriedades físico-químicas relevantes;

— dados de identificação química, como as denominações IUPAC ou CAS, número CAS, código SMILES ou InChI, fórmula estrutural, pureza, identidade química das impurezas, caso se justifique e seja exequível, etc. (incluindo o teor de carbono orgânico, se for o caso).

Substância multicomponentes, UVCB e mistura:

— caracterizada, na medida do possível, pela identidade química (ver acima), ocorrência quantitativa e propriedades físico-químicas relevantes dos componentes.

Organismos sujeitos a ensaio:

— nome científico, estirpe, fonte e método de recolha dos ovos fertilizados e posterior manuseamento.

Condições de realização dos ensaios:

— procedimento de ensaio utilizado (por exemplo, renovação semiestática);

— fotoperíodo;

— planeamento do ensaio (por exemplo, o número de câmaras de ensaio, tipos de controlos);

— características de qualidade da água na manutenção dos peixes (p. ex., pH, dureza, temperatura, condutividade e oxigénio dissolvido);

— concentração de oxigénio dissolvido, pH, dureza total, temperatura e condutividade da solução de ensaio no início e após 96 horas;

— método de preparação das soluções-padrão e soluções de ensaio, bem como a frequência de renovação;

▼M7

— justificação da utilização e da escolha do solvente, se não for água;

— concentrações nominais testadas e resultado de todas as análises efetuadas para determinação da concentração do produto químico de ensaio nos recipientes de ensaio; a eficiência de recuperação do método e do limite de quantificação (LoQ) também deverão ser registados;

— elementos comprovativos de que os controlos satisfizeram os critérios de validade;

— taxa de fertilização dos ovos;

— taxa de incubação nos grupos de tratamento e de controlo.

Resultados:

— valor da mais elevada concentração que não provoca mortalidade durante o período do ensaio;

— valor da menor concentração que provoca 100 % de mortalidade durante o período do ensaio;

— mortalidade cumulativa para cada concentração nos períodos de observação recomendados;

— valores de CL_{50} às 96 horas (e, facultativamente, às 48 horas) para a mortalidade com limites de confiança a 95 %, se possível;

— gráfico da curva concentração-mortalidade no final do ensaio;

— mortalidade nos controlos (controlos negativos, controlos internos da placa, bem como controlo positivo e qualquer controlo do solvente utilizado);

— dados sobre os resultados de cada uma das quatro observações apicais;

— incidência e descrição de anomalias morfológicas e fisiológicas, se for caso disso (ver exemplos apresentados no apêndice 5, figura 2);

— incidentes no decurso do ensaio que poderiam ter influenciado os resultados;

— análise estatística e tratamento de dados (análise da função probit, modelo de regressão logística e média geométrica para a CL_{50});

— declive e limites de confiança da regressão (transformado) da curva concentração-resposta.

Qualquer desvio do método de ensaio e explicações pertinentes.

Discussão e interpretação dos resultados.

BIBLIOGRAFIA

(1) OCDE (2011) Validation Report (Phase 1) for the Zebrafish Embryo Toxicity Test: Part I and Part II. Series on Testing and Assessment No. 157, OECD, Paris.

(2) OCDE (2012) Validation Report (Phase 2) for the Zebrafish Embryo Toxicity Test: Part I and Part II (Annexes). Series on Testing and Assessment No. 179, OECD, Paris.

(3) Braunbeck, T., Böttcher, M., Hollert, H., Kosmehl, T., Lammer, E., Leist, E., Rudolf, M. e Seitz, N. (2005) Towards an alternative for the acute fish

▼M7

LC_{50} test in chemical assessment: The fish embryo toxicity test goes multi-species-an update. ALTEX 22: 87-102.

(4) ISO (2007) International Standard Water quality — Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*). ISO 15088:2007(E) Organização Internacional de Normalização.

(5) Nagel, R. (2002) DarT: The embryo test with the zebrafish (*Danio rerio*) — a general model in ecotoxicology and toxicology. ALTEX 19: 38-48.

(6) Schulte, C. e Nagel, R. (1994) Testing acute toxicity in embryo of zebrafish, *Brachydanio rerio* as alternative to the acute fish test — preliminary results. ATLA 22, 12-19.

(7) Bachmann, J. (2002) Development and validation of a teratogenicity screening test with embryos of the zebrafish (*Danio rerio*). Tese de doutoramento, Universidade Técnica de Dresda, Alemanha.

(8) Lange, M., Gebauer, W., Markl, J. e Nagel, R. (1995) Comparison of testing acute toxicity on embryo of zebrafish (*Brachydanio rerio*), and RTG-2 cytotoxicity as possible alternatives to the acute fish test. Chemosphere 30/11: 2087-2102.

(9) Knöbel, M., Busser, F.J.M., Rico-Rico, A., Kramer, N.I., Hermens, J.L.M., Hafner, C., Tanneberger, K., Schirmer, K., Scholz, S. (2012). Predicting adult fish acute lethality with the zebrafish embryo: relevance of test duration, endpoints, compound properties, and exposure concentration analysis. Environ. Sci. Technol. 46, 9690-9700.

(10) Kammann, U., Vobach, M. e Wosniok, W. (2006) Toxic effects of brominated indoles and phenols on zebrafish embryos. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 51: 97-102.

(11) Groth, G., Kronauer, K. e Freundt, K.J. (1994) Effects of *N,N*-diemethylformamide and its degradation products in zebrafish embryos. Toxicol. *In Vitro* 8: 401-406.

(12) Groth, G., Schreeb, K., Herdt, V. e Freundt, K.J. (1993) Toxicity studies in fertilized zebrafish fish eggs treated with *N*-methylamine, *N,N*-dimethylamine, 2-aminoethanol, isopropylamine, aniline, *N*-methylaniline, *N,N*-dimethylaniline, quinone, chloroacetaldehyde, or cyclohexanol. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 50: 878-882.

(13) Nguyen, L.T. and Janssen, C.R. (2001) Comparative sensitivity of embryo-larval toxicity assays with African catfish (*Clarias gariepinus*) and zebra fish (*Danio rerio*). Environ. Toxicol. 16: 566-571.

(14) Cheng, S.H., Wai, A.W.K., So, C.H. e Wu, R.S.S. (2000) Cellular and molecular basis of cadmium-induced deformities in zebrafish embryos. Environ. Toxicol. Chem. 19: 3024-3031.

(15) Belanger, S. E., Rawlings J. M. e Carr G. J.. (2013) — Use of Fish Embryo Toxicity Tests for the Prediction of Acute Fish Toxicity to Chemicals. Environmental Toxicology and Chemistry 32: 1768-1783.

(16) Lammer, E., Carr, G. J., Wendler, K., Rawlings, J. M., Belanger, S. E., Braunbeck, T. (2009) Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.: 149 (2), 196-209

(17) Capítulo C.4 do presente anexo: Biodegradabilidade rápida.

(18) Capítulo C.29 do presente anexo: Biodegradabilidade rápida, CO_2 em recipientes fechados.

(19) Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., Broschard, T.H. (2011) Zebrafish (*Danio rerio*) embryos as a model for testing proteratogens. Toxicology 281: 25-36.

▼**M7**

(20) Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., Broschard, T.H. (2012) Developmental effects of coumarin and the anticoagulant coumarin derivative warfarin on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. Reprod. Toxicol. 33: 133-141.

(21) Incardona, J.P, Linbo, T.L., Scholz, N.L. (2011) Cardiac toxicity of 5-ring polycyclic aromatic hydrocarbons is differentially dependent on the aryl hydrocarbon receptor 2 isoform during zebrafish development. Toxicol. Appl. Pharmacol. 257: 242-249.

(22) Kubota, A., Stegeman, J.J., Woodin, B.R., Iwanaga, T., Harano, R., Peterson, R.E., Hiraga, T., Teraoka, H. (2011) Role of zebrafish cytochrome P450 CYP1C genes in the reduced mesencephalic vein blood flow caused by activation of AHR2. Toxicol. Appl. Pharmacol. 253: 244-252.

(23) Capítulo C.48 do presente anexo: Ensaio a Curto Prazo da Reprodução em Peixes. Ver apêndice 4a.

(24) Lammer, E., Kamp, H.G., Hisgen, V., Koch, M., Reinhard, D., Salinas, E.R., Wendlar, K., Zok, S., Braunbeck, T. (2009) Development of a flow-through system for the fish embryo toxicity test (FET) with zebrafish (*Danio rerio*). Toxicol. *in vitro* 23: 1436-1442.

(25) Brown, R.S., Akhtar, P., Åkerman, J., Hampel, L., Kozin, I.S., Villerius, L.A., Klamer, H.J.C., (2001) Partition controlled delivery of hydrophobic substances in toxicity tests using poly(dimethylsiloxane) (PDMS) films. Environ. Sci. Technol. 35, 4097-4102.

(26) Schreiber, R., Altenburger, R., Paschke, A., Küster, E. (2008) How to deal with lipophilic and volatile organic substances in microtiter plate assays. Environ. Toxicol. Chem. 27, 1676-1682.

(27) Norma internacional ISO (1996). Water quality — Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)]. ISO 7346-3: Flow-through method. Disponível em: [http://www.iso.org].

(28) OCDE (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Series on Testing and Assessment No. 23, OCDE, Paris.

(29) Laale, H.W. (1977) The biology and use of zebrafish, *Brachydanio rerio*, in fisheries research. A literature review. J. Fish Biol. 10: 121-173.

(30) Westerfield, M. (2007) The zebrafish book: A guide for the laboratory use of zebrafish (*Brachydanio rerio*). 5ª edição. Eugene, Imprensa da Universidade do Óregon, Instituto da Neurociência, EUA.

(31) Canadian Council on Animal Care (2005) Guidelines on: the Care and Use of Fish in Research, Teaching and Testing, ISBN: 0-919087-43-4 http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Fish.pdf

(32) Comissão Europeia (2007) Recomendação da Comissão 2007/526/CE de 18 de Junho de 2007 relativa a diretrizes sobre o alojamento e os cuidados a prestar aos animais utilizados para fins experimentais e outros fins científicos (notificada com o número C(2007) 2525) [http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:197:0001:0089:PT:PDF]

(33) União Europeia (2010) Diretiva 2010/63/UE do Parlamento Europeu e do Conselho de 22 de Setembro de 2010 relativa à proteção dos animais utilizados para fins científicos. Jornal Oficial da União Europeia, L 276:33-79; 20.10.2010

http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:PT:PDF

(34) Nagel, R. (1986) Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebrabärbling (*Brachydanio rerio*, Ham.-Buch.). J. Appl. Ichthyol. 2: 173-181.

▼**M7**

(35) Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B. e Schilling, T.F. (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. Dev. Dyn. 203: 253-310.

(36) Capítulo C.2 do presente anexo: *Daphnia* sp., Acute Immobilistaion Test.

(37) Weil, M., Scholz, S., Zimmer, M., Sacher, F., Duis, K. (2009) Gene expression analysis in zebrafish embryos: a potential approach to predict effect conentrations in the fish early life stage test. Environ. Toxicol. Chem. 28: 1970-1978

(38) Norma internacional ISO (2006). Water quality — Guidance on statistical interpretation of ecotoxicity data ISO TS 20281. Disponível em: [http://www.iso.org].

(39) OCDE (2006) Guidance Document on Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application. Series on Testing and Assessment No. 54. OCDE, Paris.

(40) Braunbeck, T., lammer, E., 2006. Detailed review paper «Fish embryo toxicity assays» UBA report under contract no. 20385422 German Federal Environment Agency, Berlim. 298 pp.

▼M7

Apêndice 1

DEFINIÇÕES

Parâmetro apical: Indicador de efeitos ao nível de toda a população.

Blástula: Formação celular em torno do polo animal que abrange uma parte determinada do saco vitelino.

Produto químico: Substância ou mistura.

Epíbole: Enorme proliferação de, predominantemente, células epidérmicas na fase de gastrulação do embrião e o seu movimento da zona dorsal para a zona ventral, através do qual, as camadas celulares endodérmicas são integradas num processo tipo de invaginação e o saco vitelino é incorporado no embrião.

Ensaio de fluxo contínuo: Um ensaio com fluxo contínuo de soluções de ensaio através do sistema de ensaio, durante o período de exposição.

Controlo Interno da Placa: Controlo interno com 4 poços cheios com água de diluição por placa de 24 poços, com vista a identificar potencias contaminações das placas pelo fabricante ou pelo investigador durante o processo e qualquer efeito da placa que possa influenciar o resultado do ensaio (p. ex., gradiente de temperatura).

IUPAC: União Internacional de Química Pura e Aplicada.

Água de manutenção: Água onde a criação dos peixes adultos é realizada.

Concentração Letal Média (CL 50): Concentração do produto químico em estudo que se estima ser letal para 50 % dos organismos de ensaio durante o ensaio.

Ensaio semiestático com renovação: Ensaio com renovação frequente das soluções de ensaio após períodos de tempo determinados (por exemplo, a cada 24 horas).

SMILES: *Simplified Molecular Input Line Entry Specification*

Somito: No desenvolvimento do embrião vertebrado, os somitos são massas de mesoderme distribuídos lateralmente ao tubo neural, que acabará por desenvolver derme (dermátomo), músculo esquelético (miótomo) e vértebras (esclerótomo).

Ensaio estático: Ensaio em que as soluções de ensaio permanecem inalteradas durante o período do ensaio.

Produto químico de ensaio: Qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado este método de ensaio.

UVCB: Substâncias de composição desconhecida ou variável, produtos de reação complexos ou materiais biológicos.

▼M7

Apêndice 2

MANUTENÇÃO, REPRODUÇÃO E CONDIÇÕES NORMAIS PARA OS ENSAIOS DE TOXICIDADE AGUDA EM EMBRIÕES DE PEIXE-ZEBRA

Peixe-zebra (*Danio rerio*)		
Origem da espécie		Índia, Birmânia, Malaca, Samatra
Dimorfismo sexual		Fêmeas: ventre proeminente, quando transportam ovos Machos: mais fino, e coloração alaranjada entre listras longitudinais azuis (especialmente patente na barbatana anal)
Alimentação		Alimento seco em flocos (máx. 3 % do peso dos peixes por dia) 3-5 vezes por dia; além disso, náuplios de artémia (*Artemia* sp.) e/ou pequenos dafnídeos de dimensão adequada proveniente de uma fonte não contaminada. O alimento vivo constitui uma fonte de enriquecimento ambiental e, por conseguinte, deve ser dado, sempre que possível. Para garantir a máxima qualidade da água, alimento em excesso e os excrementos devem ser retirados cerca de uma hora após a alimentação.
Peso aproximado do peixe adulto		Fêmeas:0,65 ±0,13 g Machos: 0,5 ±0,1 g
Manutenção dos peixes progenitores	Iluminação	Lâmpadas fluorescentes (espetro largo); 10-20 $\mu E/m^2/s$, 540-1 080 lux ou 50-100 ft-c (níveis ambientes no laboratório) 12-16 horas de fotoperíodo
	Temperatura da água	26 ±1 °C
	Qualidade da água	$O_2 \geq 80$ % de saturação, dureza: por exemplo, ~ 30-300 mg/l $CaCO_3$, NO_3^-: ≤ 48mg/l, NH_4^+ e NO_2^-: <0,001 mg/l, cloro residual < 10 µg/l, ccloro orgânico total < 25 ng/l, cpH = 6,5 – 8,5
	Outros critérios de qualidade da água	Partículas em suspensão < 20 mg/l, carbono orgânico total < 2 mg/l, pesticidas organofosforados totais < 50 ng/l, soma dos pesticidas organoclorados totais e bifenilos policlorados < 50 ng/l
	Dimensão dos reservatórios para manutenção	por exemplo, 180 l, 1 peixe/l
	Purificação de água	Permanente (carvão vegetal filtrado); outras possibilidades incluem combinações com sistemas de manutenção de renovação semiestática ou com sistemas de fluxo contínuo com renovação contínua da água
	Recomendado o rácio de reprodutores macho/ /fêmea	2: 1 (ou desova massiva)
Tanques de desova		por exemplo, tanques de 4 l equipados com grelhas de aço no fundo e plantas artificiais como estimulantes de reprodução; mantas de aquecimento externo ou desova massiva nos tanques de manutenção
Estrutura e aspeto do ovo		Córion estável (ou seja, altamente transparentes, não pegajoso, diâmetro ~ 0,8–1,5 mm)
Taxa de desova		Uma única fêmea madura deposita, pelo menos, 50-80 ovos por dia. Em função da estirpe, as taxas de desova podem ser consideravelmente mais elevadas. A taxa de fertilização deve ser ≥ 70 %. Para os peixes a desovarem pela primeira vez, as taxas de fertilização dos ovos podem ser mais baixas nas primeiras desovas.
Tipo de ensaio		Estático, de renovação semiestática, por fluxo contínuo, 26 ± 1 °C, câmaras de ensaio condicionadas 24 horas (por exemplo, placas de 24 poços 2,5-5 ml por cavidade)

▼M7

Apêndice 3

DESENVOLVIMENTO NORMAL DO PEIXE-ZEBRA A 26 °C

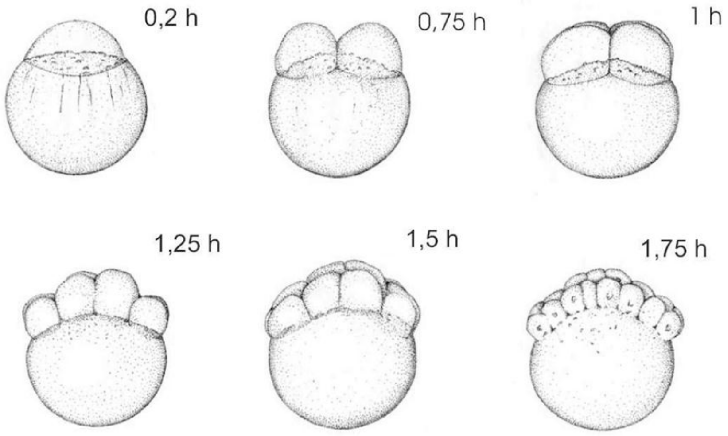


Figura 1: Fases iniciais de desenvolvimento de peixe-zebra (*Danio rerio*) selecionadas: 0,2-1,75 horas após fertilização (de Kimmel *et al*., 1995 (35)). A sequência temporal do desenvolvimento normal, pode ser tida em consideração com vista a diagnosticar tanto a fertilização como a viabilidade de ovos (ver ponto 26: Seleção de ovos fertilizados).

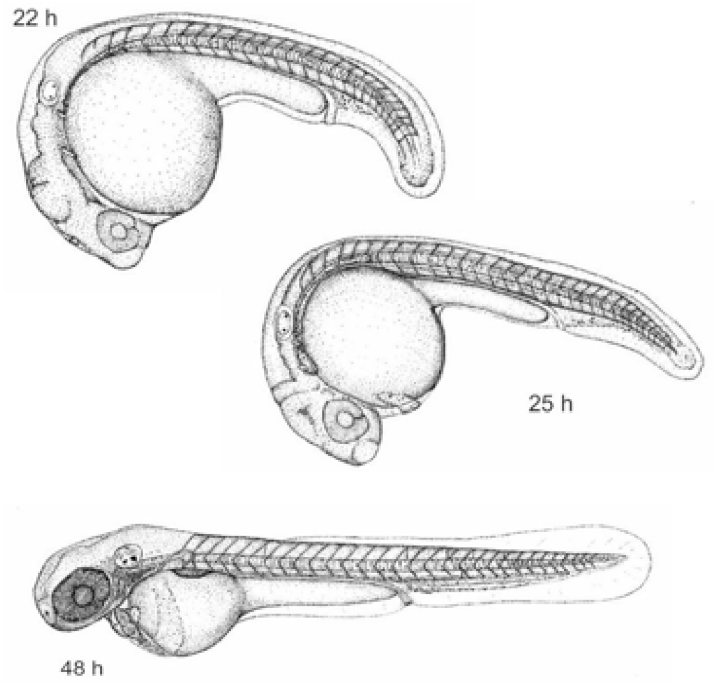


Figura 2: Fases finais de desenvolvimento de peixe-zebra (*Danio rerio*) selecionadas (embrião sem o córion para otimizar a visibilidade): 22-48 horas pós-fertilização (de Kimmel *et al*., 1995 (35)).

▼M7

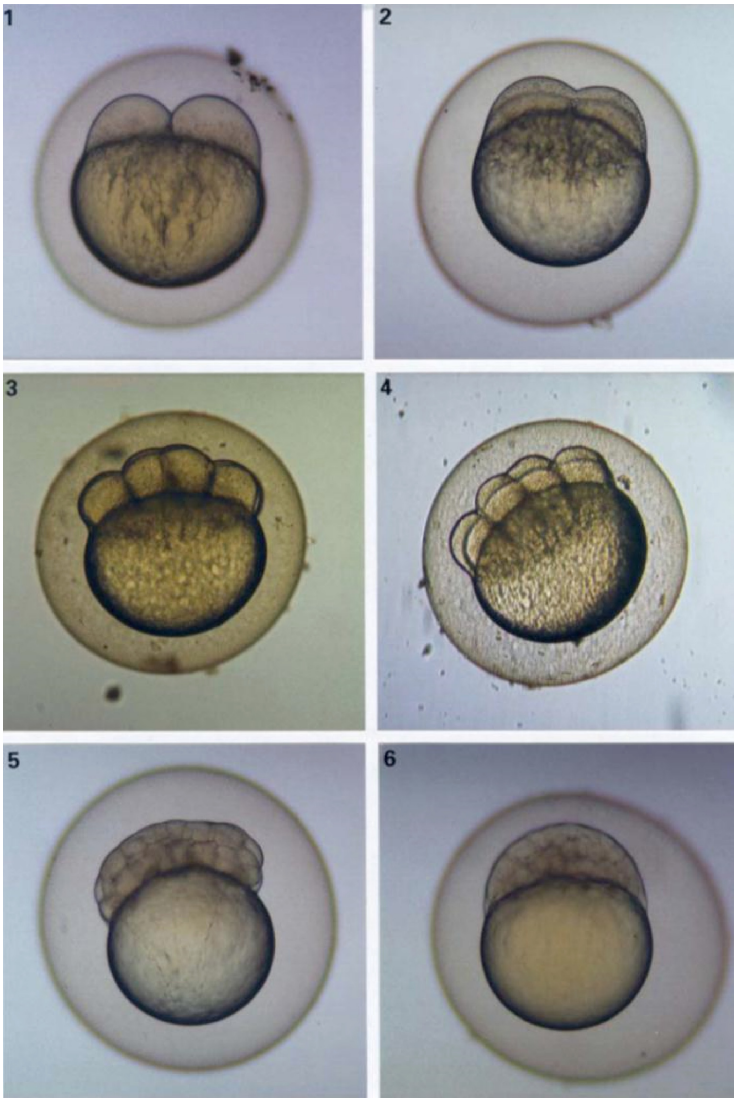


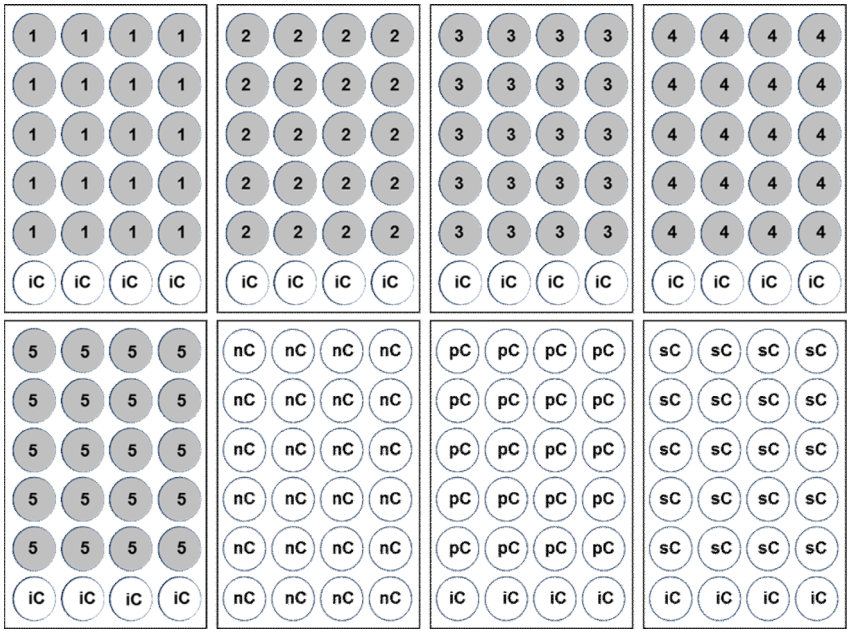
Figura 3: Desenvolvimento normal de embriões de peixe-zebra (*Danio rerio*): (1) 0,75 horas, fase de 2 células; (2) 1 hora, fase de 4 células; (3) 1,2 horas, fase de 8 células; (4) 1,5 horas, fase de 16 células; (5) 4,7 horas, início da epíbole; (6) 5,3 horas, aproximadamente 50 % da epíbole (de Braunbeck & Lammer 2006 (40))

▼**M7**

Apêndice 4

Figura 1

Disposição das placas de 24 poços



1-5 = cinco concentrações de ensaio / produto químico;

nC = controlo negativo (água de diluição);

iC = controlo interno da placa (água de diluição);

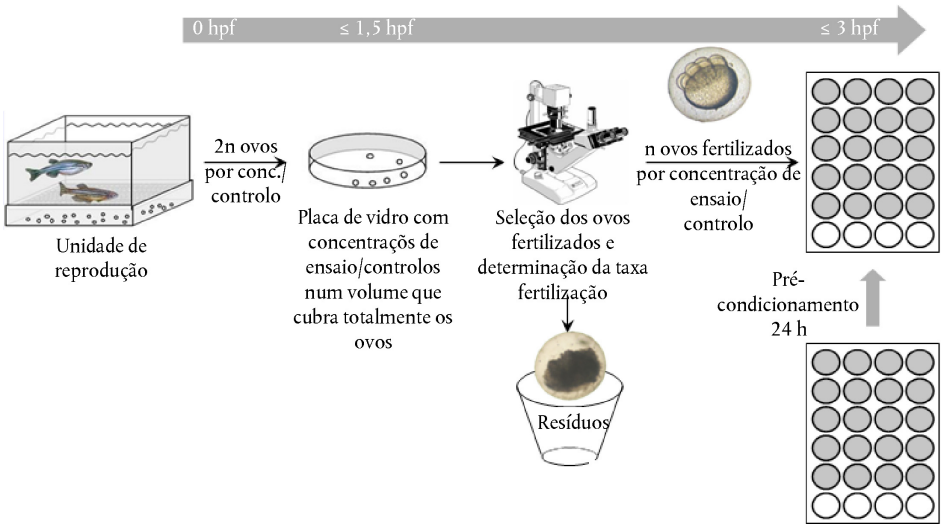
pC = controlo positivo (3,4-DCA 4mg/l);

sC = controlo do solvente

▼M7

Figura 2

Ilustração do ensaio de toxicidade aguda em embriões de peixe-zebra (da esquerda para a direita): produção de ovos, recolha dos ovos, pré-exposição imediatamente após a fertilização em recipientes de vidro, seleção de ovos fertilizados com um microscópio invertido ou binocular e distribuição de ovos fertilizados em placas de 24 poços preparados com as respetivas concentrações/controlos de ensaio, n = número de ovos necessários por concentração/controlo de ensaio (neste caso 20), hpf = horas pós-fertilização.



▼M7

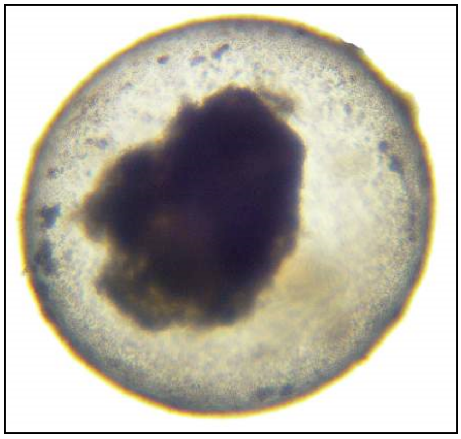
Apêndice 5

ATLAS DOS PARÂMETROS LETAIS PARA O ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA EM EMBRIÕES DE PEIXE-ZEBRA

Os seguintes parâmetros apicais indicam a toxicidade aguda e, consequentemente, a morte dos embriões: coagulação do embrião, não separação de cauda, falta de formação dos somitos e ausência de batimentos cardíacos. As seguintes micrografias foram selecionados para ilustrar estes parâmetros.

Figura 1

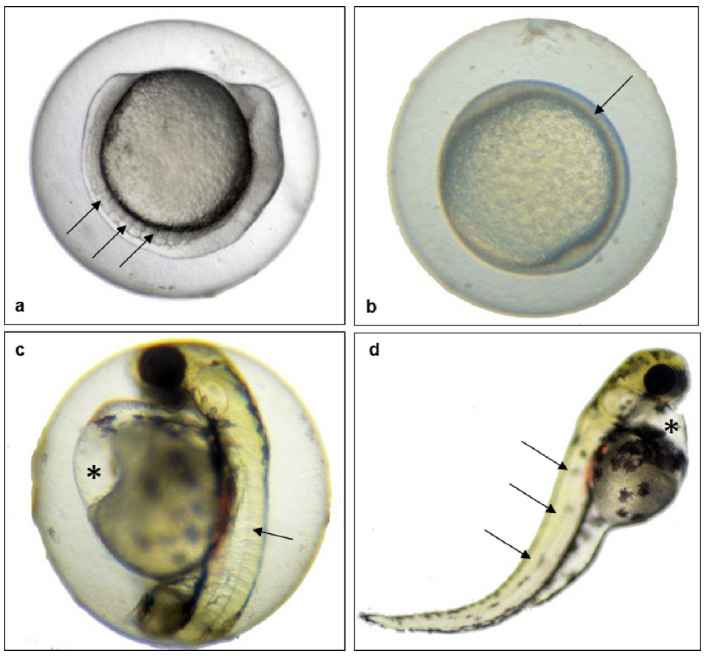
Coagulação do embrião:



Através de microscopia de campo claro, embriões de peixe-zebra coagulados mostram uma variedade de inclusões não transparentes.

Figura 2

Falta de formação dos somitos:

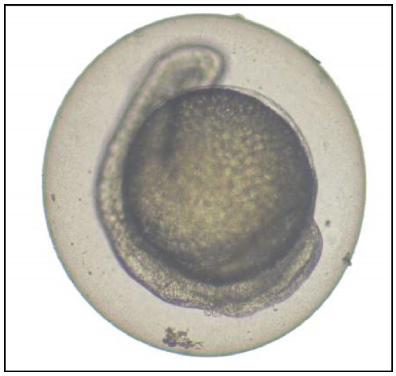


▼M7

Embora o consequente atraso no desenvolvimento de aproximadamente 10 horas, o embrião de peixe-zebra com 24 horas de idade (a) mostra somitos bem desenvolvidos (→), enquanto que o embrião (b) não revela qualquer sinal de formação de somitos (→). Embora apresentando um edema pronunciado no saco vitelino (*), o embrião de peixe-zebra com 48 horas de idade (a) mostra somitos em fases de desenvolvimento distintos (→), enquanto que o embrião de peixe-zebra com 96 horas de idade ilustrado em (d) não mostra qualquer sinal de formação de somitos Note-se também a curvatura da coluna vertebral (escoliose) e o edema pericárdico (*) no embrião indicados em (d).

Figura 3

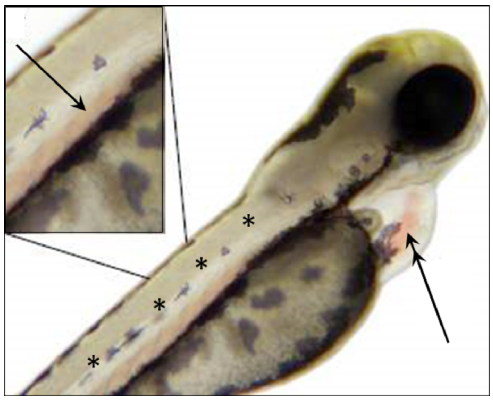
Não separação do broto da cauda em vista lateral



(a: →; embrião de peixe-zebra com 96 horas de idade). Note-se também a falta do broto do olho (*).

Figura 4

A ausência de batimentos cardíacos



A ausência de batimentos cardíacos é, por definição, difícil de ilustrar numa micrografia. A ausência de batimentos cardíacos é indicada pela não convulsão do coração (seta dupla). A imobilidade das células sanguíneas, por exemplo na aorta abdominal (→ na inserção) não é um indicador de ausência de batimentos cardíacos. Note-se também a falta de formação de somitos neste embrião (*, homogéneo e não por aparência segmentar dos tecidos musculares). O tempo de observação para registar a ausência de batimentos cardíacos deve ser pelo menos de um minuto, com uma ampliação mínima de 80 ×.

▼M7

C.50. ENSAIO DE TOXICIDADE EM *MYRIOPHYLLUM SPICATUM* SEM SEDIMENTOS

INTRODUÇÃO

1. O presente método de ensaio é equivalente ao *Test Guideline* 238 (2014) da OCDE. Foi concebido para avaliar a toxicidade de produtos químicos para a espécie *Myriophyllum spicatum*, uma dicotiledónea subaquática pertencente à família da pinheirinha-de-água. Baseia-se no atual método de ensaio ASTM (1), modificado como um sistema de ensaio isento de sedimentos (2), para estimar a ecotoxicidade intrínseca dos produtos químicos em estudo (independente da distribuição/do comportamento do produto químico em estudo entre a água e os sedimentos). Na fase aquosa, a complexidade analítica de um sistema de ensaio sem sedimentos é baixa (apenas na fase aquosa) e os resultados podem ser analisados em paralelo e/ou comparados com os resultados obtidos no ensaio com *Lemna sp.* (3); além disso, as condições de esterilidade necessárias permitem manter os efeitos dos microrganismos e das algas (absorção química/degradação, etc.) a um nível tão baixo quanto possível. Este ensaio não substitui outros ensaios de toxicidade em meio aquático; deverá, isso sim, complementá-los de modo a possibilitar uma avaliação mais completa dos riscos e dos perigos para a planta aquática. O método de ensaio foi validado por um estudo interlaboratorial (4).

2. Descrevem-se os pormenores do ensaio com renovação (semiestático) e sem renovação (estático) da solução de ensaio. Consoante os objetivos do ensaio e os requisitos regulamentares, recomenda-se a utilização do método semiestático, por exemplo, para as substâncias que desaparecem rapidamente da solução por efeito de volatilização, adsorção, fotodegradação, hidrólise, precipitação ou biodegradação. Para mais orientações, consultar a referência bibliográfica (5). Este método de ensaio aplica-se a substâncias em relação às quais o método tenha sido validado — para mais pormenores, ver o relatório do estudo interlaboratorial (4) — ou a formulações, ou misturas conhecidas; se uma mistura for objeto de ensaio, os seus constituintes devem ser, tanto quanto possível, identificados e quantificados. O método de ensaio de *Myriophyllum spicatum* sem sedimentos complementa o ensaio de toxicidade de *Myriophyllum spicatum* água-sedimento (6). Antes da aplicação do método para o ensaio de uma mistura com fins regulamentares, importa ponderar se, e em caso afirmativo, por que motivo, o método pode proporcionar resultados adequados para o efeito. Essas considerações não são necessárias se existir um requisito regulamentar para o ensaio da mistura.

PRINCÍPIO DO ENSAIO

3. Fazem-se culturas de plantas da espécie *Myriophyllum spicatum* em crescimento contínuo (apenas em meio de cultura de Andrews modificado, ver apêndice 2), com diferentes concentrações do produto químico em estudo, por um período de 14 dias, num sistema de ensaio sem sedimentos. O objetivo do ensaio consiste em quantificar os efeitos do produto químico em estudo sobre o crescimento vegetativo durante aquele período, com base na avaliação de determinadas variáveis de medição. O crescimento do comprimento dos rebentos, ramos laterais e raízes, bem como o desenvolvimento do peso fresco e do peso seco e o aumento de verticilos, são as variáveis de medição. Além disso, têm-se em conta alterações qualitativas distintivas nos organismos de ensaio, tais como a desfiguração ou clorose e necrose, indicadas por coloração amarelada ou branca e castanha. Para quantificar os efeitos relacionados com o produto químico em estudo, compara-se o crescimento nas soluções de ensaio com o dos controlos e determina-se a concentração que causa uma inibição de x % no crescimento, expressa como EC_x; «x» pode ser qualquer valor dependente dos requisitos regulamentares — p. ex., EC_{10}, EC_{20}, EC_{50}. De notar que as estimativas dos valores de EC_{10} e EC_{20} são apenas fiáveis e adequadas nos ensaios em que os coeficientes de variação nas plantas do controlo sejam inferiores ao nível de efeito estimado, ou seja, os coeficientes de variação devem ser < 20 % para a estimativa sólida de uma EC_{20}.

4. Deve determinar-se tanto a taxa média de crescimento específico (calculada com base em avaliações do comprimento do rebento principal e em três outras variáveis de medição) como o rendimento (calculado a partir do

▼M7

aumento do comprimento do rebento principal e de três outras variáveis de medição) das plantas tratadas e não tratadas. A taxa de crescimento específico (r) e o rendimento (y) são posteriormente utilizados para determinar a E_rC_x (p. ex., E_rC_{10}, E_rC_{20}, E_rC_{50}) e a E_yC_x (p. ex., E_yC_{10}, E_yC_{20}, E_yC_{50}), respetivamente.

5. Por outro lado, a menor concentração com efeito observável (LOEC) e a concentração sem efeitos observáveis (NOEC) podem ser determinadas estatisticamente.

INFORMAÇÕES SOBRE O PRODUTO QUÍMICO EM ESTUDO

6. Deve utilizar-se um método analítico com sensibilidade adequada para a quantificação do produto químico no meio de ensaio. As informações sobre o produto químico em estudo que poderão ser úteis para estabelecer as condições do ensaio são, entre outras, a fórmula estrutural, a pureza e as eventuais impurezas, a solubilidade em água, a estabilidade à luz e em água, a constante de dissociação (pK_a), o coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}), a pressão de vapor e a biodegradabilidade. A solubilidade em água e a pressão de vapor podem ser utilizadas para calcular a constante da Lei de Henry, que indicará a probabilidade da ocorrência de perdas significativas do produto químico em estudo durante o período de ensaio. Dessa forma, contribuirá para indicar se é necessário adotar medidas específicas para o controlo dessas perdas. Nos casos em que as informações sobre a solubilidade e a estabilidade do produto químico em estudo forem imprecisas, recomenda-se que estes parâmetros sejam avaliados nas condições do ensaio, ou seja, com os mesmos meio de cultura, temperatura e regime de iluminação que se utilizarão no ensaio.

7. O controlo do pH do meio é particularmente importante, por exemplo, no caso dos ensaios com metais ou substâncias hidroliticamente instáveis. Para mais pormenores sobre o ensaio de produtos químicos cujas propriedades físico-químicas dificultam o ensaio, consultar o documento de orientações da OCDE (5).

VALIDADE DO ENSAIO

8. Para que o ensaio seja válido, o tempo de duplicação do comprimento do rebento principal no grupo de controlo deve ser inferior a 14 dias. Utilizando os meios e as condições de ensaio descritos no presente método, este critério pode ser cumprido através de um regime de ensaio estático ou semiestático.

9. O coeficiente médio de variação do rendimento, com base em medições do peso fresco dos rebentos (ou seja, do início ao fim do ensaio) e em outras variáveis de medição (ver ponto 37), nas culturas de controlo, não deve exceder 35 % entre os replicados.

10. Mais de 50 % dos replicados do grupo de controlo são mantidos esterilizados durante o período de exposição de 14 dias, o que significa que, visivelmente, não estão contaminados por outros organismos, como algas, fungos e bactérias (solução límpida). *Nota*: As orientações sobre a forma de avaliar a esterilidade são apresentadas no relatório do estudo interlaboratorial (4).

PRODUTO QUÍMICO DE REFERÊNCIA

11. Para a verificação do procedimento de ensaio, podem ser ensaiados um ou mais produtos químicos de referência, como o 3,5-diclorofenol (3,5-DCP), que se utiliza no estudo interlaboratorial (4); a partir dos dados do estudo interlaboratorial, os valores médios de EC_{50} do 3,5-DCP para as diferentes variáveis de resposta (ver pontos 37-41 do presente método de ensaio) situam-se entre 3,2 mg/l e 6,9 mg/l (ver relatório do estudo interlaboratorial para informações sobre o intervalo de confiança destes valores). É aconselhável submeter a ensaio um produto químico de referência pelo menos duas vezes por ano ou, se os ensaios forem realizados com menor frequência, em paralelo com a determinação da toxicidade do produto químico em estudo.

▼M7

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Equipamento

12. Todos os equipamentos que entram em contacto com os meios de ensaio devem ser de vidro ou de outro material quimicamente inerte. O material de vidro utilizado para culturas e ensaios deve ser isento de quaisquer contaminantes químicos que possam passar para o meio de ensaio e deve ser esterilizado. Os recipientes de ensaio devem ser suficientemente grandes para que os rebentos nos recipientes de controlo possam crescer na fase aquosa sem atingir a superfície do meio de ensaio no final do mesmo. Recomendam-se tubos de ensaio de vidro de borossilicato de paredes espessas sem rebordo, diâmetro interior de aproximadamente 20 mm, comprimento de aproximadamente de 250 mm e com tampas de alumínio.

13. Uma vez que o meio de cultura de Andrews modificado contém sacarose (que estimula o crescimento de fungos e bactérias), as soluções de ensaio devem ser preparadas em condições estéreis. Todos os líquidos, bem como o equipamento, são esterilizados antes da utilização. A esterilização é efetuada por tratamento com ar aquecido (210 °C), durante 4 horas ou em autoclave durante 20 minutos a 121 °C. Além disso, todos os frascos, pratos, vasos, etc., e outros equipamentos, são submetidos a tratamento à chama numa bancada de trabalho estéril, imediatamente antes da utilização.

14. As culturas e os recipientes de ensaio não devem ser conservados juntos. Para tal, o melhor será utilizar câmaras de crescimento, incubadoras ou mesmo salas separadas. A iluminação e a temperatura devem ser controláveis e mantidas a um nível constante.

Organismo de ensaio

15. O*Myriophyllum spicatum* — uma dicotiledónea subaquática — é uma espécie da família da pinheirinha-de-água. Entre junho e agosto, flores rosa-esbranquiçadas impercetíveis assomam acima da superfície da água. As plantas estão enraizadas no solo por um sistema sólido de rizomas e podem ser encontradas em águas eutróficas não poluídas e em águas minerais mais calcificadas com substrato enlameado, em todo o hemisfério norte. A espécie *Myriophyllum spicatum* prefere água doce, mas também é encontrada em águas salobras.

16. Para o ensaio de toxicidade sem sedimentos, são necessárias plantas estéreis. Se o laboratório não dispuser de culturas regulares de *Myriophyllum spicatum*, é possível obter material vegetal estéril de outro laboratório, ou extrair material vegetal não estéril do campo ou ainda obtê-lo através de um fornecedor comercial; se as plantas forem provenientes do campo, deve prever-se uma verificação taxonómica da espécie. Quando forem recolhidas no campo ou obtidas através de um fornecedor comercial, as plantas devem ser esterilizadas (1) e mantidas em cultura no mesmo meio que será utilizado para o ensaio durante, pelo menos, oito semanas antes do mesmo. Os locais de colheita no campo onde se faz a recolha de culturas de arranque devem estar isentos de fontes evidentes de poluição. É necessário tomar precauções especiais para garantir que é obtida a espécie correta na recolha de *Myriophyllum spicatum* no campo, especialmente nas regiões em que esta é capaz de se cruzar com outras espécies de *Myriophyllum*. Caso sejam obtidas de outro laboratório, as plantas devem ser mantidas da mesma forma durante, pelo menos, três semanas. Deve ser sempre indicada a origem do material vegetal e da espécie utilizada para o ensaio.

17. A qualidade e a uniformidade das plantas utilizadas para o ensaio terão influência significativa no resultado, pelo que as mesmas devem ser selecionadas cuidadosamente. Devem utilizar-se plantas jovens, de crescimento rápido e sem lesões ou descoloração (clorose) visíveis. O apêndice 4 apresenta mais informações sobre a preparação do organismo de ensaio.

Cultura

18. Para reduzir a frequência da manutenção das culturas — por exemplo, durante os períodos em que não se prevejam ensaios com *Myriophyllum* —, estas podem ser conservadas em ambiente escuro e a baixa temperatura ($50\ \mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$, 20 ± 2 °C). O apêndice 3 apresenta mais informações sobre as técnicas de cultura.

▼M7

19. Pelo menos 14 a 21 dias antes do ensaio, um número suficiente de organismos de ensaio será transferido, em condições asséticas, para meio fresco esterilizado e cultivado durante 14 a 21 dias nas condições de ensaio, como pré-cultura. O apêndice 4 apresenta mais informações sobre as técnicas de pré-cultura.

Meio de ensaio

20. Apenas um meio nutriente é recomendado para *Myriophyllum spicatum* num sistema de ensaio sem sedimentos, conforme descrito no apêndice 2. Recomenda-se uma modificação do meio de cultura de Andrews para as culturas e os ensaios com *Myriophyllum spicatum*, como se descreve em (1). A partir de cinco soluções de reserva de nutrientes, elaboradas separadamente com adição de sacarose a 3 %, prepara-se o meio de cultura de Andrews modificado. O apêndice 2 apresenta mais informações sobre a preparação do meio.

21. Para a obtenção de soluções de ensaio (por diluição conforme adequado), é necessário o meio de cultura de Andrews modificado e dez vezes concentrado. A composição deste meio é dada no apêndice 2.

Soluções de ensaio

22. As soluções de ensaio são geralmente preparadas por diluição de soluções de reserva. As soluções de reserva do produto químico em estudo são normalmente preparadas por dissolução do produto químico em água desmineralizada (destilada ou desionizada). A adição dos nutrientes é realizada utilizando o meio de cultura de Andrews modificado e dez vezes concentrado.

23. As soluções de reserva do produto químico em estudo podem ser esterilizadas em autoclave a 121 °C durante 20 minutos ou por filtração através de membrana, desde que a técnica de esterilização utilizada não desnature o produto químico em estudo. As soluções de ensaio podem também ser preparadas em água desmineralizada ou meio, em condições estéreis. A termoestabilidade e a adsorção sobre diferentes superfícies devem ser ponderadas na seleção do processo de esterilização das soluções de reserva do produto químico em estudo. Por isso, recomenda-se que as soluções de reserva sejam preparadas em condições estéreis, ou seja, utilizando material estéril para a dissolução do produto químico em estudo em água esterilizada e em condições de esterilidade (por exemplo, esterilização à chama, dispositivos de fluxo laminar, etc.). Esta técnica de preparação de soluções de reserva esterilizadas é válida tanto para as substâncias como para as misturas.

24. A concentração mais elevada do produto químico em estudo no ensaio não deve, normalmente, ser superior ao limite de solubilidade em água do produto nas condições de ensaio. No caso de produtos químicos com baixa solubilidade em água, poderá ser necessário preparar uma solução de reserva concentrada ou dispersar o produto por meio de um dispersante ou solvente orgânico, de modo a facilitar a adição de quantidades exatas do produto químico ao meio de ensaio e as suas dispersão e dissolução. Devem ser desenvolvidos todos os esforços para evitar utilizar materiais desse tipo. A utilização de dispersantes ou de solventes auxiliares não deverá acarretar qualquer fitotoxicidade. A acetona e a dimetilformamida, por exemplo, incluem-se entre os solventes mais comuns que não causam fitotoxicidade em concentrações até 100 µl/l. Caso se utilize um dispersante ou um solvente, deve especificar-se a sua concentração final, tão baixa quanto possível ($\leq$ 100 µl/l), e todos os recipientes de exposição e de controlo devem ser expostos à mesma concentração de dispersante ou solvente. Para mais orientações sobre a utilização de dispersantes, consultar a referência bibliográfica (5).

Grupos de ensaio e de controlo

25. O conhecimento prévio da toxicidade do produto químico em estudo para a *Myriophyllum spicatum* — determinada com base nos resultados de ensaios de determinação da gama de concentrações — permite uma mais fácil escolha das concentrações a utilizar no ensaio. No ensaio de toxicidade definitivo, devem,

▼M7

geralmente, estudar-se cinco (tal como no ensaio de inibição de crescimento com *Lemna*, capítulo C.26 do presente anexo) a sete concentrações de ensaio, em progressão geométrica; devem ser escolhidas de modo a que os valores da NOEC e da EC_{50} sejam abrangidos pela gama de concentrações (ver abaixo). De preferência, o fator de separação entre as concentrações de ensaio não deve ser superior a 3,2; no entanto, poderá ser utilizado um valor mais elevado quando a curva de concentração-resposta for pouco pronunciada. Deve apresentar-se uma justificação caso se utilizem menos de cinco concentrações. Devem ser utilizados pelo menos cinco replicados de cada concentração de ensaio.

26. Para efeitos da definição da gama de concentrações (tanto nos ensaios de determinação da gama quanto nos ensaios de toxicidade definitivos) devem tomar-se em conta os seguintes elementos:

Para a determinação de uma EC_x, as concentrações de ensaio devem abranger o valor da EC_x, de modo a garantir um nível de confiança apropriado. Por exemplo, para a determinação da EC_{50}, a concentração de ensaio mais elevada deve ser superior ao valor de EC_{50}. Se o valor de EC_{50} se situar fora da gama de concentrações ensaiadas, os intervalos de confiança associados serão maiores, o que poderá impossibilitar o ajustamento de um modelo estatístico.

Se o objetivo for a determinação da LOEC/NOEC, a concentração mais baixa ensaiada deve ser suficientemente baixa para que o crescimento não seja significativamente inferior ao dos controlos. Por outro lado, a concentração mais elevada a ensaiar deve ser suficientemente alta para que o crescimento seja significativamente inferior ao do controlo. De outro modo, o ensaio terá de ser repetido com uma gama de concentrações diferente (exceto se a concentração máxima já se encontrar perto do limite de solubilidade ou da concentração máxima pretendida, por exemplo, 100 mg/l).

27. Todos os ensaios devem incluir controlos constituídos pelo mesmo meio nutriente e organismo de ensaio (a escolha do material vegetal deve ser tão homogénea quanto possível, novos ramos laterais de pré-culturas, reduzidos a 2,5 cm desde a base), que estejam sujeitos às mesmas condições ambientais e procedimentos que os recipientes de ensaio, mas sem adição do produto químico em estudo. Caso se utilize um dispersante ou solvente auxiliar, o ensaio deve incluir um controlo suplementar, com a mesma concentração de solvente/dispersante que os recipientes com o produto químico em estudo. O número de replicados dos recipientes de controlo (e de recipientes com solvente, se aplicável) deve ser pelo menos dez.

28. Caso não seja necessário determinar a NOEC, o ensaio poderá ser alterado de modo a aumentar o número de concentrações estudadas, reduzindo o número de replicados por concentração. Em todo o caso, o número de replicados dos controlos deve, no entanto, ser de, pelo menos, dez.

Exposição

29. Novos ramos laterais da pré-cultura reduzidos a 2,5 cm desde a base são distribuídos aleatoriamente pelos recipientes de ensaio, em condições assépticas; cada recipiente de ensaio contém um ramo lateral de 2,5 cm que deve ter um meristema apical numa ponta. O material vegetal escolhido deve ser da mesma qualidade em cada um dos recipientes de ensaio.

30. A colocação aleatória dos frascos de ensaio na incubadora é necessária para reduzir ao mínimo a influência das diferenças espaciais em termos de intensidade da luz ou de temperatura. É igualmente necessário mudar a posição dos frascos, por blocos ou de forma aleatória, após as amostragens ou mais frequentemente.

31. Se um ensaio preliminar de estabilidade mostrar que, no período de ensaio (14 dias), a concentração do produto químico em estudo não pode ser mantida (ou seja, se a concentração medida diminuir mais de 80 % em relação à concentração inicial medida), recomenda-se a utilização de um regime de ensaio semiestático. Nesse caso, as plantas devem ser expostas

▼M7

a soluções de ensaio e de controlo preparadas no momento em, pelo menos, uma ocasião durante o ensaio (por exemplo, no dia 7). A frequência da exposição ao meio fresco dependerá da estabilidade do produto químico em estudo; poderá ser necessária uma frequência maior para manter quase constantes as concentrações de substâncias altamente instáveis ou voláteis.

32. A possibilidade de exposição através de aplicação foliar (aspersão) não está prevista no presente método de ensaio.

Condições de ensaio

33. Deve ser utilizada iluminação fluorescente com luz branca quente e/ou fria, para proporcionar uma radiação luminosa na gama de aproximadamente 100--150 μE m^{-2} s^{-1}, medida num comprimento de onda de fotossíntese (400--700 nm) em pontos que se encontrem à mesma distância da fonte luminosa que o fundo dos recipientes de ensaio (intensidade equivalente de 6 000 a 9 000 lux), recorrendo a um ciclo de 16 horas de luz seguidos de 8 horas de escuridão. O método de deteção e medição da luz e, em particular, o tipo de sensor utilizado, afetarão o valor medido. Os sensores esféricos (que reagem à luz proveniente de todos os ângulos acima e abaixo do plano de medição) e os sensores «de cosseno» (que respondem à luz proveniente de todos os ângulos acima do plano de medição) são preferíveis aos sensores unidirecionais e fornecem leituras mais elevadas para as fontes múltiplas de luz do tipo aqui descrito.

34. A temperatura dos recipientes de ensaio deve ser mantida a 23 ± 2 °C. Contudo, em certos casos, como, por exemplo, nos ensaios de produtos químicos instáveis ou de metais, poderá ser necessário adotar cuidados adicionais em relação à variação de pH; o pH deve permanecer no intervalo de 6-9. Para mais informações, consultar a referência bibliográfica (5).

Duração

35. O ensaio terminará 14 dias depois de as plantas terem sido transferidas para os recipientes de ensaio.

Medições e determinações analíticas

36. No início do ensaio, o comprimento do rebento principal do organismo de ensaio é de 2,5 cm (ver ponto 29); este é medido com uma régua (ver apêndice 4), ou pela análise de imagens e fotografias. O comprimento do rebento principal do organismo de ensaio que apresenta um aspeto normal e anormal deve ser determinado no início do ensaio, pelo menos uma vez durante o período de exposição de 14 dias e no final do ensaio. Nota: Como alternativa para os laboratórios que não dispõem de análise de imagens, se a bancada de trabalho estiver esterilizada antes da adição de plantas nos recipientes de ensaio, pode também utilizar-se uma régua estéril para medir o comprimento dos rebentos principais no início e durante o ensaio. Qualquer alteração observada no desenvolvimento das plantas, por exemplo, no que respeita à deformação e ao aspeto dos rebentos, a indicações de necrose, clorose, à desagregação ou perda de flutuabilidade ou à dimensão e aspeto das raízes, deverá ser registada. As características mais significativas do meio de ensaio (por exemplo, presença de materiais em suspensão, crescimento de algas, fungos e bactérias nos recipientes de ensaio) devem também ser registadas.

37. Para além da determinação do comprimento do rebento principal durante o ensaio, devem também ser avaliados os efeitos do produto químico em estudo sobre três — ou mais — das seguintes variáveis de medição:

i. Comprimento total dos ramos laterais

ii. Comprimento total do rebento

iii. Comprimento total da raiz

iv. Peso fresco

v. Peso seco

vi. Número de verticilos

▼M7

Nota 1: As observações feitas durante o ensaio de determinação da gama de concentrações poderiam ajudar na seleção das medições adicionais relevantes entre as seis variáveis acima enumeradas.

Nota 2: A determinação dos pesos seco e fresco (parâmetros iv e v) é altamente desejável.

Nota 3: Dado que a sacarose e a luz (ou seja, a exposição das raízes à luz durante o ensaio) podem influenciar os transportadores de auxinas (hormonas de crescimento vegetal) e que alguns produtos químicos podem ter um modo de ação do tipo da auxina, a inclusão de pontos finais relativos à raiz (parâmetro iii) é questionável.

Nota 4: Os resultados do estudo interlaboratorial mostram um elevado coeficiente de variação (> 60 %) para o comprimento total do ramo lateral (parâmetro i). De qualquer forma, o comprimento total do ramo lateral é incluído no comprimento total do rebento (parâmetro ii) que mostre coeficientes de variação de < 30 % mais aceitáveis.

Nota 5: Atendendo às considerações precedentes, os principais pontos finais recomendados são os seguintes: comprimento total dos rebentos, peso fresco e peso seco (parâmetros ii, iv e v); o parâmetro vi — número de verticilos — é deixado ao critério do experimentador.

38. O comprimento do rebento principal e o número de verticilos dispõem de uma vantagem, na medida em que podem ser determinados para cada recipiente de ensaio e de controlo, no início, durante e no final do ensaio, por análise de imagens e fotografias, embora possa também utilizar-se uma régua estéril.

39. O comprimento total dos ramos laterais, o comprimento total da raiz (soma de todos os ramos laterais ou raízes) e o comprimento total dos rebentos (soma do comprimento do rebento principal e do comprimento total dos ramos laterais) podem ser medidos com uma régua no final do período de exposição.

40. O peso fresco e/ou seco deverá ser determinado no início do ensaio a partir de uma amostra da pré-cultura, representativa do que é utilizado para iniciar o ensaio, e no final do mesmo, com o material retirado das plantas de cada recipiente de ensaio e de controlo.

41. O comprimento total dos ramos laterais, o comprimento total dos rebentos, o comprimento total da raiz, o peso fresco, o peso seco e o número de verticilos podem ser determinados do seguinte modo:

    i. Comprimento total dos ramos laterais: o comprimento total dos ramos laterais pode ser determinado pela medição de todos esses ramos com uma régua, no final do período de exposição. É a soma de todos os ramos laterais de cada recipiente de ensaio e de controlo.

    ii. Comprimento total do rebento: o comprimento do rebento principal pode ser determinado por análise visual ou utilizando uma régua. É a soma do comprimento total dos ramos laterais e do comprimento do rebento principal de cada recipiente de ensaio e de controlo, no final do período de exposição.

    iii. Comprimento total da raiz: o comprimento da raiz pode ser determinado pela medição de todas as raízes com uma régua no final do período de exposição. É a soma de todas as raízes de cada recipiente de ensaio e de controlo.

    iv. Peso fresco: o peso fresco pode ser determinado por pesagem dos organismos de ensaio no final do período exposição. Qualquer material vegetal proveniente de cada recipiente de ensaio e de controlo deverá ser

▼M7

enxaguado com água destilada e secado com papel de celulose. Após esta preparação, o peso fresco é determinado por pesagem. A biomassa de partida (peso fresco) é determinada com base numa amostra dos organismos de ensaio extraída do mesmo lote utilizado para inocular os recipientes de ensaio.

v. Peso seco: após a preparação para a determinação do peso fresco, os organismos de ensaio são secados a 60 °C até se obter um peso constante. Esta massa é o peso seco. A biomassa de partida (peso seco) é determinada com base numa amostra dos organismos de ensaio extraída do mesmo lote utilizado para inocular os recipientes de ensaio.

vi. Número de verticilos: todos os verticilos serão contabilizados ao longo do rebento principal.

Frequência das medições e determinações analíticas

42. Caso se utilize um método de ensaio estático, deve medir-se o pH de cada tratamento no início e no final do ensaio. No caso dos ensaios semiestáticos, deve medir-se o pH da solução de ensaio «fresca» antes da sua utilização, bem como o pH das correspondentes soluções «usadas»

43. A intensidade luminosa deve ser medida, na câmara de crescimento, incubadora ou sala, em pontos que estejam à mesma distância da fonte de luz que os organismos de ensaio. A medição deverá ser efetuada pelo menos uma vez durante o ensaio. Deve ser registada diariamente a temperatura do meio contido num recipiente especialmente destinado para esse efeito e mantido nas mesmas condições na câmara de crescimento, incubadora ou sala utilizada para o ensaio (ou continuamente com um registador de dados).

44. Durante o ensaio, as concentrações do(s) produto(s) químico(s) em estudo devem ser determinadas a intervalos adequados. Nos ensaios estáticos, a exigência mínima é que as concentrações sejam determinadas no início e no final do ensaio.

45. Nos ensaios semiestáticos em que não seja de esperar que as concentrações do(s) produto(s) químico(s) em estudo se mantenham no intervalo de ± 20 % da concentração nominal, é necessário analisar todas as soluções de ensaio no momento em que forem preparadas e também imediatamente antes da respetiva utilização. No entanto, para os ensaios em que a concentrações iniciais medidas do(s) produto(s) químico(s) em estudo não se encontrem no intervalo de ± 20 % do valor nominal, mas em que se possam fornecer provas suficientes de que as concentrações iniciais são reprodutíveis e estáveis (isto é, se mantêm dentro da gama 80-120 % da concentração inicial), as determinações químicas podem ser limitadas às concentrações maior e menor usadas no ensaio. Em qualquer dos casos, só é necessária a determinação das concentrações de ensaio antes da sua utilização num dos recipientes replicados para cada concentração de ensaio (ou no conteúdo agrupado de todos os recipientes replicados).

46. Se existirem provas de que a concentração de ensaio não variou mais de ± 20 % relativamente ao valor da concentração nominal ou da concentração inicial medida, a análise dos resultados pode basear-se nos valores nominais ou iniciais medidos. Se a variação relativamente à concentração nominal ou à concentração inicial medida for superior a ± 20 %, a análise dos resultados deve basear-se na média geométrica da concentração durante a exposição ou em modelos que descrevam a diminuição da concentração do produto químico em estudo (5).

Ensaio no limite

47. Em determinadas circunstâncias — por exemplo, se um ensaio preliminar indicar que o produto químico em estudo não apresenta efeitos tóxicos em concentrações até 100 mg/l ou até ao seu limite de solubilidade no meio de ensaio, ou no caso de uma fórmula até ao seu limite de capacidade de dispersão —, pode proceder-se a um ensaio no limite, com comparação

▼M7

das respostas de um grupo de controlo e de um grupo exposto ao produto químico em estudo a uma concentração de 100 mg/l ou que corresponda ao limite de solubilidade. Recomenda-se fortemente que isso seja confirmado por análise da concentração de exposição. Todas as condições de ensaio e critérios de validade anteriormente descritos são aplicáveis aos ensaios no limite, com exceção da necessidade de utilizar o dobro do número de replicados dos recipientes expostos. O crescimento dos grupos de controlo e de exposição pode ser analisado através de um ensaio estatístico de comparação das médias, como, por exemplo, o teste t de Student.

DADOS E RELATÓRIOS

Variáveis de resposta

48. O objetivo do ensaio consiste em determinar os efeitos de um produto químico sobre o crescimento vegetativo de *Myriophyllum spicatum*. O presente método de ensaio descreve duas variáveis de resposta.

a) Taxa média de crescimento específico: esta variável de resposta é calculada com base no aumento logarítmico do comprimento do rebento principal e, adicionalmente, na evolução logarítmica de outros parâmetros de medição — isto é, comprimento total dos rebentos, peso fresco, peso seco ou número de verticilos em função do tempo (por dia) —, tanto nos recipientes de controlo como nos grupos expostos. Nota: No que se refere ao parâmetro de medição relativo ao comprimento total dos ramos laterais e ao comprimento total das raízes não é possível fazer um cálculo da taxa média de crescimento específico. No início do ensaio, o organismo (com base na preparação da pré-cultura) não tem ramos laterais nem raízes; a partir do valor zero, o cálculo da taxa média de crescimento específico não é definido.

b) Rendimento: esta variável de resposta é calculada com base no aumento do comprimento do rebento principal e, adicionalmente, na evolução de outros parâmetros de medição — de preferência, o comprimento total dos rebentos, o peso fresco, o peso seco ou o número de verticilos e outros parâmetros, caso se considere útil — tanto nos recipientes de controlo como nos grupos expostos até ao final do ensaio.

49. As estimativas da toxicidade devem basear-se no comprimento do rebento principal e em três outras variáveis de medição (de preferência, o comprimento total do rebento, o peso fresco, o peso seco ou o número de verticilos — ver ponto 37 e notas 2, 4 e 5 do presente ponto), já que certos produtos químicos podem afetar outras variáveis de medição de forma muito mais marcada do que o comprimento do rebento principal. Esse efeito passará despercebido se o cálculo se basear exclusivamente no comprimento do rebento principal.

Taxa média de crescimento específico

50. A taxa média de crescimento específico durante um determinado período é calculada como o aumento logarítmico das variáveis de crescimento — comprimento do rebento principal e outras três variáveis de medição (comprimento total do rebento, peso fresco, peso seco ou número de verticilos) — aplicando a fórmula que a seguir se apresenta aos valores obtidos para cada replicado dos controlos e dos recipientes expostos ao produto químico em estudo:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

em que:

μ_{i-j}: taxa média de crescimento específico entre o momento i e o momento j

N_i: variável de medição no recipiente de ensaio ou de controlo no momento i

N_j: variável de medição no recipiente de ensaio ou de controlo no momento j

t: período decorrido entre i e j

▼M7

Para cada um dos grupos de exposição e de controlo, calcular um valor médio da taxa de crescimento, associado às respetivas estimativas da variância.

51. Calcula-se a taxa média de crescimento específico para a totalidade do período de ensaio (na fórmula acima, «i» é o momento inicial e «j» o momento final do ensaio). Para cada uma das concentrações de ensaio e de controlo, calcular o valor médio da taxa média de crescimento específico, associado às respetivas estimativas da variância. Deve também avaliar-se a taxa de crescimento em cada secção do ensaio, para verificar os efeitos do produto químico durante o período de exposição (por exemplo, pela análise das curvas de crescimento após transformação logarítmica).

52. Pode então calcular-se a percentagem de inibição da taxa de crescimento (I_r) para cada concentração de ensaio (grupo exposto), de acordo com a seguinte fórmula:

$$\%I_r = \frac{(\mu_C - \mu_T)}{\mu_C} \times 100$$

em que:

% Ir: inibição percentual da taxa média de crescimento específico

μC: valor médio de μ no controlo

μT: valor médio de μ no grupo de tratamento

Rendimento

53. Os efeitos sobre o rendimento são determinados com base na variável de medição relativa ao comprimento do rebento principal e em três outras variáveis de medição (de preferência, o comprimento total do rebento, o peso fresco, o peso seco ou o número de verticilos) para cada recipiente de ensaio, no início e no final do ensaio. No que se refere ao peso fresco ou o peso seco, a biomassa de partida é determinada com base numa amostra dos organismos de ensaio extraída do mesmo lote utilizado para inocular os recipientes de ensaio. Para cada uma das concentrações de ensaio e para os controlos, calcular um valor médio de rendimento, associado às respetivas estimativas da variância. Para cada grupo exposto, a percentagem média de inibição do rendimento ($\%I_y$) pode ser calculada do seguinte modo:

$$\%I_y = \frac{(b_c - b_T)}{b_c}$$

em que:

% Iy: redução percentual do rendimento

bC: biomassa final menos biomassa inicial do grupo de controlo

bT: biomassa final menos biomassa inicial do grupo exposto

Tempo de duplicação

54. Para determinar o tempo de duplicação (T_d) do comprimento do rebento principal e verificar o cumprimento do critério de validade correspondente (ponto 8), aplica-se a seguinte fórmula aos dados obtidos a partir dos recipientes de controlo:

$T_d = \ln 2/\mu$

Onde μ é a taxa média de crescimento específico, determinada de acordo com os pontos 50-52.

▼M7

Representação gráfica das curvas concentração-resposta

55. Devem representar-se as curvas de concentração-resposta, que relacionam a percentagem média de inibição da variável de resposta (I_r, ou I_y, calculadas como se indica no ponto 53) com o logaritmo da concentração do produto químico em estudo.

Estimativa da EC_x

56. As estimativas da EC_x devem basear-se tanto na taxa média de crescimento específico (E_rC_x) como no rendimento (E_yC_x), devendo cada uma destas medidas, por seu turno, basear-se no comprimento do rebento principal e, eventualmente, em outras variáveis de medição (de preferência, comprimento total do rebento, peso fresco, peso seco ou número de verticilos). Tal deve-se ao facto de certos produtos químicos afetarem de forma diferente o comprimento do rebento principal e outras variáveis de medição. Os parâmetros de toxicidade pretendidos são, portanto, quatro valores de EC_x para cada um dos níveis de inibição x calculados: E_rC_x (comprimento do rebento principal); E_rC_x (de preferência, comprimento total do rebento, peso fresco, peso seco ou número de verticilos); E_yC_x (comprimento do rebento principal); e E_yC_x (de preferência, comprimento total do rebento, peso fresco, peso seco ou número de verticilos).

57. Cabe aqui notar que os valores de EC_x calculados através destas duas variáveis de resposta não são comparáveis e que a diferença entre esses valores é reconhecida para efeitos da utilização dos resultados do ensaio. Os valores de EC_x baseados na taxa média de crescimento específico (E_rC_x) são, na maioria dos casos, mais elevados do que os resultados baseados no rendimento (E_yC_x) — se forem seguidas as condições de ensaio apresentadas no presente método de ensaio —, devido à base matemática das respetivas abordagens. Esta diferença não deve ser interpretada como uma diferença de sensibilidade entre as duas variáveis de resposta, mas simplesmente como uma diferença matemática entre os valores.

Procedimentos estatísticos

58. O objetivo consiste em descrever a relação concentração-resposta de forma quantitativa, por análise de regressão Pode utilizar-se uma regressão linear ponderada, antecedida de uma transformação de linearização dos dados de resposta, por exemplo, com modelos probit, logit ou de Weibull (7), mas a técnica preferida é a aplicação de procedimentos de regressão não linear, que permitem lidar melhor com as inevitáveis irregularidades dos dados e com os desvios em relação a uma boa distribuição. Nas zonas próximas da inibição nula ou total, essas irregularidades podem mesmo ser aumentadas pela transformação, o que irá interferir com a análise (7). Cabe aqui notar que os métodos-padrão de análise que utilizam os transformados probit, logit ou de Weibull se destinam à análise de dados quantais (por exemplo, mortalidade ou sobrevivência), pelo que terão de ser alterados para lidar com os dados relativos à taxa de crescimento ou ao rendimento. Alguns métodos para a determinação dos valores de EC_x a partir de dados contínuos podem ser consultados em (8), (9) e (10).

59. Para cada uma das variáveis de resposta em análise, utilizar a relação concentração-resposta para estimar os valores pontuais de EC_x. Sempre que possível, devem determinar-se os intervalos de confiança a 95 % para cada estimativa. A adequação do ajustamento da curva estimada pelo modelo de regressão aos dados de resposta deve ser avaliada, graficamente ou por métodos estatísticos. A análise por regressão deve utilizar os valores de cada replicado e não o valor médio para cada grupo exposto.

60. As estimativas da EC_{50} e os respetivos intervalos de confiança podem também ser obtidos utilizando uma interpolação linear com *bootstrapping* (10), quando os modelos/métodos de regressão disponíveis não forem aplicáveis aos dados existentes.

61. Para a estimativa da LOEC e, portanto, da NOEC, será necessário comparar as médias dos recipientes expostos, utilizando técnicas de análise da variância (ANOVA). A média para cada concentração é então comparada com a média observada nos controlos, utilizando um método apropriado de comparação múltipla ou de análise das tendências. Os testes de Dunnett ou de Williams (12)(13)(14)(15)(16) poderão ser úteis para esse efeito. É necessário verificar se é cumprido o pressuposto de homogeneidade da variância das análises ANOVA. Essa verificação poderá ser realizada graficamente ou através de um teste formal (15). Os testes de Levene ou de Bartlett são

▼M7

adequados neste contexto. O problema colocado pelo incumprimento do pressuposto de homogeneidade das variâncias pode, por vezes, ser corrigido através da transformação logarítmica dos dados. Caso a heterogeneidade das variâncias seja extrema e não possa ser corrigida por transformação, deve ponderar-se a possibilidade de utilizar métodos de análise das tendências como, por exemplo, o método degressivo de Jonkheere. Para mais orientações sobre a determinação da NOEC, consultar a referência (10).

62. Os avanços científicos mais recentes conduziram à recomendação de que fosse abandonado o conceito de NOEC, que deverá ser substituído pela estimativa dos valores de EC_x por regressão. No caso do presente ensaio com *Myriophyllum*, não foi definido nenhum valor ideal para «x» No entanto, o intervalo de 10-20 % parece ser apropriado (dependendo da variável de resposta escolhida), devendo ser comunicados, de preferência, tanto os valores de EC_{10} como de EC_{20}.

Relatórios

63. O relatório do ensaio inclui as seguintes informações:

Produto químico em estudo

Substância monocomponentes:

— aspeto físico, solubilidade em água e outras propriedades físico-químicas relevantes;

— dados de identificação química, como as denominações IUPAC ou CAS, número CAS, código SMILES ou InChI, fórmula estrutural, pureza, identidade química das impurezas, caso se justifique e seja exequível, etc. (incluindo o teor de carbono orgânico, se for o caso).

Substância multicomponentes, UVCB ou mistura:

— caracterizada, na medida do possível, pela identidade química (ver acima), ocorrência quantitativa e propriedades físico-químicas relevantes dos componentes.

Espécie de ensaio

— Nome científico e fonte.

Condições de ensaio

— Procedimento de ensaio utilizado (estático ou semiestático).

— Data de início do ensaio e respetiva duração.

— Meio de ensaio.

— Descrição do método experimental: recipientes e tampas utilizados no ensaio, volumes das soluções, comprimento do rebento principal em cada recipiente de ensaio, no início do mesmo.

— Concentrações de ensaio (nominais ou medidas, conforme adequado) e número de replicados por concentração.

— Métodos de preparação das soluções de reserva e de ensaio, incluindo a eventual utilização de solventes ou dispersantes.

— Temperatura durante o ensaio.

— Fonte luminosa, intensidade e homogeneidade da luz.

— Valores de pH dos meios de controlo e de ensaio.

— Método de análise do produto químico em estudo, juntamente com os dados adequados à avaliação da qualidade do método (estudos de validação, desvios-padrão ou intervalos de confiança das análises).

▼M7

— Métodos para a determinação do comprimento do rebento principal e outras variáveis de medição, como, p. ex., o comprimento total dos ramos laterais, o comprimento total do rebento, o comprimento total da raiz, o peso fresco, o peso seco ou o número de verticilos.

— O estado da cultura (estéril ou não estéril) de cada recipiente de ensaio e de controlo, para cada momento de amostragem.

— Todos os desvios em relação ao presente método de ensaio.

Resultados

— Dados brutos: comprimento do rebento principal e outras variáveis de medição em cada recipiente de ensaio e de controlo, para cada momento de amostragem e momento de realização da análise.

— Médias e desvios-padrão para cada variável de medição.

— Curvas de crescimento para cada variável de medição.

— Variáveis de resposta calculadas para cada replicado exposto, com os respetivos valores médios e coeficiente de variação dos replicados.

— Representação gráfica da relação concentração/efeito.

— Estimativas dos pontos finais de toxicidade para as variáveis de resposta, por exemplo, EC_{50}, EC_{10}, EC_{20}, e os intervalos de confiança associados. Se forem calculados, valores da LOEC e/ou da NOEC e métodos estatísticos utilizados para a respetiva determinação.

— Caso tenha sido efetuada uma análise ANOVA, dimensão do efeito detetado (por exemplo, diferenças menos significativas).

— Ocorrência de estimulação do crescimento observada em qualquer dos grupos expostos.

— Sinais visuais de fitotoxicidade, bem como quaisquer observações em relação às soluções de ensaio.

— Discussão dos resultados, incluindo qualquer influência nestes decorrente de alterações do presente método de ensaio.

REFERÊNCIAS

(1) ASTM Designation E 1913-04, Standard Guide for Conducting Static, Axenic, 14-Day Phytotoxicity Tests in Test Tubes with the Submersed Aquatic Macrophyte, *Myriophyllum sibiricum* Komarov.

(2) Maletzki, D. *et al*. (2010), *Myriophyllum spicatum* als ökotoxikologischer Testorganismus: Methodenentwicklung eines sedimentfreien Testsystems und erste Ergebnisse mit 3,5-Dichlorphenol, *Umweltwiss Schadst Forsch,* n.º 22, pp. 702–710.

(3) Capítulo C.26 do presente anexo*: Ensaio de inibição de crescimento com Lemna sp.*,.

(4) OCDE (2014), «*Myriophyllum spicatum* Toxicity Test: Results of an inter-laboratory ring test using a sediment-free test system» OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series Testing and Assessment, n.º 205, OECD Publishing, Paris.

(5) OCDE (2000), «Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures» OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, n.º 23, OECD Publishing, Paris.

(6) Capítulo C.51 do presente anexo: Ensaio de toxicidade de *Myriophyllum spicatum* — água-sedimento

▼**M7**

(7) Christensen, E.R., N. Nyholm (1984), Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves, *Environmental Science & Technology*, Vol. 18/9, 713-718.

(8) Nyholm, N. *et al*. (1992), Statistical treatment of data from microbial toxicity tests, *Environmental Toxicology and Chem*istry, Vol. 11/2, pp. 157--167.

(9) Bruce, R.D., D.J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 11/10, pp. 1485-1494.

(10) OCDE (2006), «Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application» OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, n.º 54, OECD Publishing, Paris.

(11) Norberg-King, T.J. (1988), An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach, National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88, US EPA, Duluth, MN.

(12) Dunnett, C.W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, *Journal of the American Statistical Association*, Vol. 50/272, pp. 1096-1121.

(13) Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, *Biometrics*, Vol. 20/3, pp. 482-491.

(14) Williams, D.A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, *Biometrics*, Vol. 27/1, pp. 103-117.

(15) Williams, D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, *Biometrics*, Vol. 28/2, pp. 519-531.

(16) Brain, P., R. Cousens (1989), An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses, *Weed Research*, Vol. 29/2, pp. 93-96.

▼M7

Apêndice 1

DEFINIÇÕES

Biomassa: peso fresco e/ou seco da matéria viva presente numa população. No presente ensaio, a biomassa é constituída pela soma do rebento principal, de todos os ramos laterais e de todas as raízes.

Produto químico: uma substância ou mistura.

Clorose: alteração de cor — de verde para amarelada — do organismo de ensaio, em especial dos verticilos.

EC_x: concentração do produto químico em estudo dissolvido no meio de ensaio que resulta numa redução de x % (por exemplo, 50 %) no crescimento de *Myriophyllum spicatum* num determinado período de exposição (que deverá ser explicitamente mencionado nos casos em que se afaste da duração total ou normal do ensaio). A fim de indicar de forma inequívoca se o valor de EC se refere à taxa de crescimento ou ao rendimento, o símbolo «E_rC» é utilizado no primeiro caso e o símbolo «E_yC» no segundo, sendo seguidos da designação da variável de medição utilizada, por exemplo, E_rC (comprimento do rebento principal).

Crescimento: aumento da variável de medição, por exemplo, comprimento do rebento principal, comprimento total dos ramos laterais, comprimento total do rebento, comprimento total da raiz, peso fresco, peso seco ou número de verticilos, no período de ensaio.

Taxa de crescimento (taxa média de crescimento específico): aumento logarítmico da variável de medição durante o período de exposição. *Nota*: As variáveis de resposta relacionadas com a taxa de crescimento são independentes da duração do ensaio desde que o padrão de crescimento dos organismos de controlo não expostos seja exponencial.

Menor concentração com efeito observável (LOEC): concentração mais baixa à qual se observa que o produto químico em estudo tem um efeito estatisticamente significativo ($p < 0,05$) de redução do crescimento, quando comparada com o controlo, para um determinado período de exposição. No entanto, todas as concentrações de ensaio superiores à LOEC devem ter um efeito prejudicial igual ou superior ao verificado com a LOEC. Quando estas duas condições não puderem ser satisfeitas, deverá ser fornecida uma explicação pormenorizada sobre a forma como se determinou a LOEC (e, consequentemente, a NOEC).

Variáveis de medição: qualquer tipo de variável que seja medida para permitir a determinação do ponto final do ensaio, utilizando uma ou mais variáveis de resposta. No presente método de ensaio, o comprimento do rebento principal, o comprimento total dos ramos laterais; o comprimento total do rebento, o comprimento total da raiz, o peso fresco, o peso seco e o número de verticilos são variáveis de medição.

Monocultura: cultura com uma única espécie de planta.

Necrose: tecido morto (ou seja, branco ou castanho escuro) do organismo de ensaio.

Concentração sem efeitos observáveis (NOEC): concentração de ensaio imediatamente inferior à LOEC.

Variável de resposta: uma variável de estimativa da toxicidade, derivada de qualquer das variáveis medidas que descrevem a biomassa nos diferentes métodos de cálculo. No presente método de ensaio, a taxa de crescimento e o rendimento são variáveis de resposta derivadas de variáveis de medição como o comprimento do rebento principal, o comprimento total do rebento, o peso fresco, o peso seco ou o número de verticilos.

Ensaio semiestático (com renovação): ensaio em que a solução de ensaio é periodicamente substituída, em momentos específicos do ensaio.

▼M7

Ensaio estático: ensaio durante o qual não há renovação da solução de ensaio.

Produto químico em estudo: qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado o presente método de ensaio.

Ponto final do ensaio: descreve, em termos gerais, o fator que será alterado pelo produto químico em estudo, por comparação com o controlo, e cuja identificação é o objetivo do ensaio. No presente método, o ponto final é a inibição do crescimento, que pode ser expressa por diferentes variáveis de resposta, baseadas em uma ou mais variáveis de medição.

Meio de ensaio: meio sintético completo de crescimento em que as plantas de ensaio são cultivadas quando expostas ao produto químico em estudo. Em geral, o produto químico em estudo é dissolvido no meio de ensaio.

UVCB: uma substância de composição desconhecida ou variável, produto de reação complexo ou material biológico.

Rendimento: valor de uma variável de medição que exprime a diferença entre a biomassa no final do período de exposição e o valor dessa variável de medição no início do período de exposição. Nota: quando o padrão de crescimento dos organismos não expostos é exponencial, as variáveis de resposta com base no rendimento diminuirão ao longo do ensaio.

▼M7

Apêndice 2

MEIO DE CULTURA DE ANDREWS MODIFICADO PARA A CULTURA DE RESERVA E A PRÉ-CULTURA

A partir de cinco soluções de reserva de nutrientes, elaboradas separadamente, prepara-se o meio de cultura de Andrews modificado para a cultura de reserva e a pré-cultura, com adição de sacarose a 3 %.

Quadro 1

Composição da solução de nutrientes de Andrews: (Norma ASTM E 1913-04)

Produção de soluções de reserva de nutrientes			Produção da solução de nutrientes
Solução de reserva	Produto químico	Peso inicial por 1 000 ml	ml por 5 l de solução de nutrientes
1	KCl	74,6 mg	50
	KNO_3	8,08 g	
	$Ca(NO_3)_2 \times 4\ H_2O$	18,88 g	
2	$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	9,86 g	50
3	Ver abaixo — solução de reserva 3.1		50
4	KH_2PO_4	2,72 g	50
5	$FeSO_4 \times 7\ H_2O$	0,278 g	50
	$Na_2EDTA \times 2\ H_2O$	0,372 g	

As soluções de reserva podem ser conservadas num frigorífico durante seis meses (a 5-10 °C). Apenas a solução de reserva n.º 5 apresenta um prazo de validade reduzido (dois meses).

Quadro 2

Produção da solução de reserva 3.1 para a preparação da solução de reserva 3

Produto químico	Peso inicial g/100 ml
$MnSO_4 \times 4\ H_2O$	0,223
$ZnSO_4 \times 7\ H_2O$	0,115
H_3BO_3	0,155
$CuSO_4 \times 5\ H_2O$	0,0125
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \times 4\ H_2O$	0,0037

Após a produção da solução de reserva 3.1 (quadro 2), esta solução deve ser congelada em alíquotas de cerca de 11 ml (pelo menos a – 18 °C). As porções ultracongeladas têm um prazo de validade de cinco anos.

Para produzir a solução de reserva 3, descongelar a solução de reserva 3.1, encher um balão volumétrico de 1 l com 10 ml da mesma e adicionar água ultrapura até ao traço de aferição do balão.

Para obter o meio de cultura de Andrews modificado, encher um balão volumétrico de 5 l com aproximadamente 2 500 ml de água ultrapura. Após adicionar 50 ml de cada solução de reserva, encher 90 % do balão volumétrico com água ultrapura e estabelecer um pH de 5,8.

▼M7

Em seguida, adicionar 150 g de sacarose dissolvida (3 % por 5 l); seguidamente, encher o balão volumétrico com água ultrapura até ao traço de aferição. Por último, enchem-se frascos de Schott de 1 l com a solução de nutrientes que é esterilizada em autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

A solução de nutrientes produzida deste modo pode ser mantida esterilizada num frigorífico (a 5-10 °C) durante três meses.

Meio de cultura de Andrews modificado para ensaio de toxicidade sem sedimentos

Das cinco soluções de reserva de nutrientes já referidas nos quadros 1 e 2, será preparado um meio de cultura de Andrews modificado e dez vezes concentrado para obter as soluções de ensaio, com a adição de sacarose a 30 %. Para tal, encher um balão volumétrico de 1 l com aproximadamente 100 ml de água ultrapura. Após a adição de 100 ml de cada uma das soluções de reserva, estabelecer um pH de 5,8. Em seguida, adicionar sacarose dissolvida a 30 % (300 g por 1 000 ml); seguidamente, encher o balão volumétrico com água ultrapura até ao traço de aferição.

Por último, enchem-se frascos de Schott de 0,5 l com a solução de nutrientes que é esterilizada em autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

A solução de nutrientes modificada e dez vezes concentrada produzida deste modo pode ser mantida esterilizada num frigorífico (a 5-10 °C) durante três meses.

▼M7

Apêndice 3

CONSERVAÇÃO DAS CULTURAS DE RESERVA

No presente apêndice 3, descreve-se a cultura de reserva de *Myriophyllum spicatum* L ([1]), uma dicotiledónea subaquática da família da pinheirinha-de-água. Entre junho e agosto, flores rosa-esbranquiçadas impercetíveis assomam acima da superfície da água. As plantas estão enraizadas no solo por um sistema sólido de rizomas e podem ser encontradas em águas eutróficas não poluídas e em águas minerais mais calcificadas com substrato enlameado, em todo o hemisfério norte. A espécie *Myriophyllum spicatum* prefere água doce, mas também é encontrada em águas salobras.

São necessárias plantas estéreis para uma cultura de reserva sem sedimentos em condições laboratoriais. As plantas estéreis encontram-se disponíveis no laboratório de ecotoxicologia do *Umweltbundesamt* (Agência Federal do Ambiente) da Alemanha.

Em alternativa, é possível preparar organismos de ensaio a partir de plantas não estéreis em conformidade com a norma ASTM E 1913-04. Ver abaixo — extraído do guia da ASTM — o procedimento de cultura de *Myriophyllum sibiricum* recolhida no campo:

> «Caso se utilizem plantas não estéreis recolhidas no campo, recolher turiões de *M. sibiricum* no outono. Colocar os turiões num aquário de 20 l com 5 cm de sedimentos estéreis cobertos por areia silicosa ou, por exemplo, Turface® e 18 l de água com baixo teor de carbono. Arejar o aquário e mantê-lo a uma temperatura de 15 °C e um caudal de 200 a 300 μmol m^{-2} s^{-1} durante 16 h por dia. A cultura de plantas no aquário pode ser conservada como fonte de reserva de plantas, caso as culturas de plantas estéreis sejam destruídas por uma anomalia mecânica na estufa de crescimento, por contaminação ou por outro motivo. As plantas cultivadas no aquário não são estéreis e as culturas estéreis não podem ser conservadas num sistema de cultura descontínua. Para esterilizar a cultura, as plantas são removidas do aquário e enxaguadas com um fluxo de água desionizada durante cerca de 0,5 h. Em condições asséticas numa câmara de fluxo de ar laminar, as plantas são desinfetadas durante menos de 20 minutos — até que a maior parte do tecido vegetal se encontre branqueada e apenas o ápice em crescimento permaneça verde — numa solução de hipoclorito de sódio a 3 % (m/v) com 0,01 % de um tensioativo adequado. Agitar o desinfetante e o material vegetal. Os segmentos com vários nós são transferidos para tubos de cultura estéreis com 45 ml de meio de cultura de Andrews modificado e esterilizado tapados com tampas simples. Coloca-se apenas um segmento da planta em cada câmara de ensaio. Utiliza-se película vedante de laboratório para assegurar que o recipiente se mantém fechado. Após o estabelecimento de uma cultura estéril, os segmentos de planta que contêm vários nós devem ser transferidos para novas câmaras de ensaio com novos meios de nutrientes líquidos a cada dez a doze dias. Tal como demonstrado pela cultura em placas de ágar, as plantas devem ser esterilizadas e permanecer estéreis durante oito semanas antes de ser possível dar início ao ensaio.»

Uma vez que o meio de cultura de Andrews modificado contém sacarose (que estimula o crescimento de fungos e bactérias), todos os materiais, soluções e culturas devem ser preparados em condições estéreis. Todos os líquidos, bem como o equipamento, são esterilizados antes da utilização. A esterilização é efetuada por tratamento com ar aquecido (210 °C), durante 4 horas, ou em autoclave, durante 20 minutos a 121 °C. Além disso, todos os frascos, pratos, vasos, etc., e outros equipamentos, são submetidos a tratamento à chama na bancada de trabalho estéril imediatamente antes da utilização.

As culturas de reserva podem ser conservadas a iluminação reduzida e baixa temperatura (50 μE m^{-2} s^{-1}, 20 ± 2 °C) por longos períodos, sem que seja necessário proceder à sua transferência periódica. O meio de crescimento de *Myriophyllum* deve ser o mesmo que é utilizado para os ensaios, mas as culturas de reserva também podem ser conservadas noutros meios ricos em nutrientes.

([1]) Carl von Linné (*Råshult /Älmhult, 23 de maio de 1707,; † Uppsala, 10 de janeiro de 1778).

▼M7

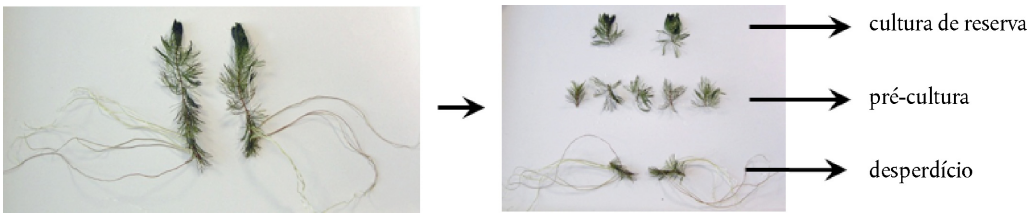
Os segmentos de plantas são distribuídos em culturas puras em vários balões de Erlenmeyer de 500 ml ou/e balões de Fernbach de 2 000 ml, cada um com aproximadamente 450 ml ou/e 1 000 ml, respetivamente, de meio de cultura de Andrews modificado. Em seguida, os balões são fechados em cultura pura com um tampão de celulose.

Além disso, é absolutamente necessário submeter o equipamento a tratamento à chama na bancada de trabalho estéril, imediatamente antes da utilização. Consoante o número e a dimensão, as plantas devem ser transferidas para novas soluções de nutrientes aproximadamente de três em três semanas.

É possível utilizar os ápices, bem como segmentos da parte central do caule, para esta renovação da cultura. O número e a dimensão das plantas transferidas (ou dos segmentos das plantas) dependem do número de plantas necessárias. Por exemplo, é possível transferir cinco segmentos de rebentos para um balão de Fernbach e três segmentos de rebentos para um balão de Erlenmeyer, cada um dos quais com um comprimento de 5 cm. Devem rejeitar-se todas as partes enraizadas, em fase de floração, mortas ou com outras características visíveis deste tipo.

Figura 1

Corte de plantas para a pré-cultura e a cultura de reserva após três semanas de cultura.



A cultura das plantas deve ser efetuada em balões de Erlenmeyer de 500 ml e balões de Fernbach de 2 000 ml numa incubadora refrigerada a 20 ± 2 °C com luz contínua a aproximadamente 100-150 µE m^{-2} s^{-1} ou 6 000-9 000 Lux (emitida por iluminação da câmara com a temperatura cromática «luz branca quente»).

Figura 2

Cultura de plantas numa incubadora refrigerada com iluminação da câmara.



Devem utilizar-se frascos de cultura quimicamente limpos (lavados com ácido) e estéreis e técnicas de manuseamento em condições de assepsia. Em caso de contaminação da cultura de reserva, por exemplo, por algas, fungos e/ou bactérias, deve preparar-se uma nova cultura ou deve utilizar-se uma cultura de reserva de outro laboratório para a renovação dessa cultura.

▼M7

Apêndice 4

MANUTENÇÃO DA PRÉ-CULTURA E PREPARAÇÃO DO ORGANISMO PARA O ENSAIO

Para obter a pré-cultura, cortar rebentos da cultura de reserva em segmentos com dois verticilos cada; colocar os segmentos em balões de Fernbach com meio de cultura de Andrews modificado (com sacarose a 3 %). Cada balão pode conter, no máximo, 50 segmentos de rebentos. Todavia, é necessário tomar precauções para que os segmentos estejam vivos e não apresentem quaisquer raízes nem ramos laterais ou botões (ver figura 1 no apêndice 3).

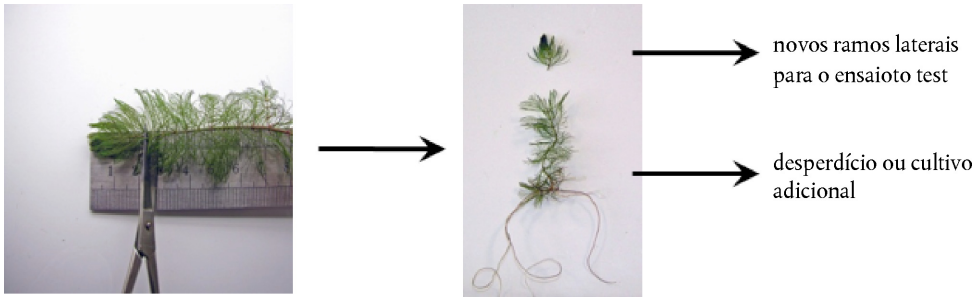
Os organismos da pré-cultura são cultivados durante 14 a 21 dias em condições estéreis, numa câmara com ambiente condicionado com fases alternadas de luz/obscuridade de 16/8 horas. Intensidade da luz selecionada da gama de 100-150 µE m^{-2} s^{-1}. A temperatura dos recipientes de ensaio deve ser mantida a 23 ± 2 °C.

Uma vez que o meio de cultura de Andrews modificado contém sacarose — que estimula o crescimento de algas, fungos e bactérias —, as soluções do produto químico devem ser preparadas e cultivadas em condições estéreis. Todos os líquidos, bem como o equipamento, são esterilizados antes da utilização. A esterilização é efetuada por tratamento com ar aquecido (210 °C), durante 4 horas, ou em autoclave, durante 20 minutos a 121 °C. Além disso, todos os frascos, pratos, vasos, etc., e outros equipamentos, são submetidos a tratamento à chama na bancada de trabalho estéril imediatamente antes da utilização.

Os rebentos são removidos em cultura pura dos frascos de pré-cultura, selecionando-se material tão homogéneo quanto possível. Cada ensaio exige, pelo menos, 60 organismos de ensaio (ensaio com oito concentrações do produto químico em estudo). Para o ensaio, retiram-se novos ramos laterais das pré--culturas, estes são encurtados para 2,5 cm desde a base (medidos com régua) e transferidos para um copo com meio de Andrews modificado e estéril. Estes novos ramos laterais podem ser utilizados para o ensaio de toxicidade em *Myriophyllum spicatum* sem sedimentos.

Figura 2

Corte de plantas da pré-cultura para o ensaio de toxicidade em *Myriophyllum spicatum* sem sedimentos.



▼M7

C.51. ENSAIO DE TOXICIDADE DE *MYRIOPHYLLUM SPICATUM* ÁGUA-SEDIMENTO

INTRODUÇÃO

1. O presente método de ensaio é equivalente ao *Test Guideline* 239 (2014) da OCDE. Encontram-se disponíveis métodos de ensaio para monocotiledóneas aquáticas flutuantes, para a espécie *Lemna* (1) e para espécies de algas (2). Estes métodos são habitualmente utilizados para gerar dados relativos ao risco dos produtos químicos em estudo, em especial dos produtos químicos com atividade herbicida, para as espécies de plantas aquáticas não visadas. Contudo, em alguns casos, podem ser necessários dados para espécies de macrófitos adicionais. As orientações recentes publicadas com base nas sessões de trabalho da Sociedade de Toxicologia e Química Ambiental (SETAC) sobre a avaliação dos riscos dos pesticidas para os macrófitos aquáticos (AMRAP) sugeriram que podem ser necessários dados respeitantes a uma espécie de macrófitos enraizados, no que se refere aos produtos químicos a cujo modo de ação se saiba que a *Lemna* e as algas não são sensíveis, ou se a partição do sedimento constituir uma preocupação, conduzindo à exposição através da absorção pela raiz (3). Com base no conhecimento e experiência atuais, a *Myriophyllum* spp foi selecionada como a espécie preferível nos casos em que são necessários dados respeitantes a uma dicotiledónea enraizada e subaquática (4) (5) (6). Este ensaio não substitui outros ensaios de toxicidade em meio aquático; deverá, isso sim, complementá-los de modo a possibilitar uma avaliação mais completa dos riscos e dos perigos para a planta aquática. O método de ensaio de *Myriophyllum spicatum* água-sedimento complementa o ensaio de toxicidade de *Myriophyllum spicatum* sem sedimentos (7).

2. O presente documento descreve um método de ensaio que permite a avaliação dos efeitos de um produto químico na espécie aquática enraizada *Myriophyllum spicatum*, cultivada num sistema água-sedimento. O método de ensaio baseia-se parcialmente em métodos existentes (1) (2) (8) e tem em conta as investigações recentes relacionadas com a avaliação de risco das plantas aquáticas (3). O método água-sedimento foi validado por um estudo interlaboratorial internacional realizado com a espécie *Myriophyllum* cultivada em condições estáticas, exposta ao produto químico em estudo mediante aplicações efetuadas através da coluna de água (9). Todavia, o sistema de ensaio é facilmente adaptado para permitir a exposição através de sedimentos enriquecidos ou da fase aquosa, em cenários semiestáticos ou de dose pulsada, embora estes cenários não tenham sido formalmente objeto de estudos interlaboratoriais. Além disso, o método geral pode ser utilizado para outras espécies enraizadas, subaquáticas e anfíbias, nomeadamente outras espécies *Myriophyllum* — p. ex., *Myriophyllum aquaticum* — e *Glyceria maxima* (10). Pode ser necessário efetuar alterações às condições, à conceção e à duração do ensaio para espécies alternativas. Designadamente, é necessário envidar esforços adicionais para definir procedimentos adequados aplicáveis ao *Myriophyllum aquaticum*. Estas opções não são apresentadas em pormenor no presente método de ensaio, que descreve a abordagem-padrão para a exposição de *Myriophyllum spicatum* num sistema estático através da fase aquosa.

3. Este método de ensaio aplica-se a substâncias em relação às quais tenha sido validado — para mais pormenores, ver o relatório do estudo interlaboratorial (9) — ou a formulações, ou misturas conhecidas. É possível efetuar um ensaio de *Myriophyllum* para cumprir um requisito de dados de nível 1 desencadeado por possíveis problemas relativos à partição do produto químico no sedimento ou ao modo de ação/seletividade. De igual modo, pode ser necessário realizar um ensaio laboratorial em *Myriophyllum* no contexto de uma estratégia de nível superior para lidar com preocupações relacionadas com o risco para as plantas aquáticas. O motivo específico para a realização de um ensaio determinará a via de exposição (por exemplo, através da água ou do sedimento). Antes da aplicação do presente método para o ensaio de uma mistura com fins regulamentares, importa ponderar se, e em caso afirmativo, por que motivo, o método pode proporcionar resultados adequados para o efeito. Essas considerações não são necessárias se existir um requisito regulamentar para o ensaio da mistura.

▼M7

PRINCÍPIO DO ENSAIO

4. O ensaio foi concebido para avaliar os efeitos dos produtos químicos no crescimento vegetativo de plantas *Myriophyllum* cultivadas em meios normalizados (água, sedimentos e nutrientes). Para o efeito, ápices de rebentos de plantas saudáveis que não se encontrem em estado de floração são incorporados num sedimento artificial normalizado, complementado com nutrientes adicionais a fim de garantir o crescimento adequado das plantas, e posteriormente conservados em meio de Smart e Barko (apêndice 1). Após um período de estabelecimento, para permitir a formação de raízes, as plantas são expostas a uma série de concentrações de ensaio adicionadas à coluna de água. Em alternativa, é possível simular a exposição através do sedimento mediante o enriquecimento do sedimento artificial com o produto químico em estudo e a transferência das plantas para o sedimento enriquecido. Em ambos os casos, as plantas são subsequentemente mantidas em condições ambientais controladas durante 14 dias. Os efeitos sobre o crescimento são determinados a partir de avaliações quantitativas do comprimento, do peso fresco e do peso seco do rebento, bem como de observações qualitativas de sintomas como clorose, necrose ou deformidades de crescimento.

5. Para quantificar os efeitos relacionados com o produto químico em estudo, compara-se o crescimento nas soluções de ensaio com o crescimento das plantas de controlo e determina-se a concentração que causa uma inibição de x % no crescimento, expressa como EC_x; «x» pode ser qualquer valor dependente dos requisitos regulamentares — p. ex., EC_{10} EC_{20} e EC_{50}. De notar que as estimativas dos valores de EC_{10} e EC_{20} são apenas fiáveis e adequadas nos ensaios em que os coeficientes de variação nas plantas do controlo sejam inferiores ao nível de efeito estimado, ou seja, os coeficientes de variação devem ser < 20 % para a estimativa sólida de uma EC_{20}.

6. Deve determinar-se tanto a taxa média de crescimento específico (calculada com base em avaliações do comprimento, do peso fresco e do peso seco do rebento) como o rendimento (calculado com base no aumento do comprimento, do peso fresco e do peso seco do rebento) das plantas tratadas e não tratadas. A taxa de crescimento específico (r) e o rendimento (y) são posteriormente utilizados para determinar a E_rC_x (p. ex., E_rC_{10}, E_rC_{20}, E_rC_{50}) e a E_yC_x (p. ex., E_yC_{10}, E_yC_{20}, E_yC_{50}), respetivamente.

7. Se necessário, a menor concentração com efeito observável (LOEC) e a concentração sem efeitos observáveis (NOEC) podem ser determinadas estatisticamente a partir das estimativas do rendimento e das taxas médias de crescimento específico.

INFORMAÇÕES SOBRE O PRODUTO QUÍMICO EM ESTUDO

8. Deve utilizar-se um método analítico com sensibilidade adequada para a quantificação dos produtos químicos no meio de ensaio.

9. As informações sobre o produto químico em estudo que podem ser úteis para estabelecer as condições do ensaio são, entre outras, a fórmula estrutural, a composição — no caso de substâncias multiconstituintes, UVCB, misturas ou formulações —, a pureza, a solubilidade em água, a estabilidade à luz e em água, a constante de dissociação (pK_a), o coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}), o K_d dos sedimentos — se conhecido —, a pressão de vapor e a biodegradabilidade. A solubilidade em água e a pressão de vapor podem ser utilizadas para calcular a constante da Lei de Henry, que permitirá verificar a probabilidade de perdas significativas do produto químico em estudo durante o período de ensaio. Caso sejam prováveis perdas dos produtos químicos, as mesmas devem ser quantificadas, devendo documentar-se os procedimentos subsequentes para as controlar. Nos casos em que as informações sobre a solubilidade e a estabilidade do(s) produto(s) químico(s) em estudo forem imprecisas, recomenda-se que estas propriedades sejam avaliadas nas condições do ensaio, ou seja, com os mesmos meio de cultura, temperatura e regime de iluminação que se utilizarão no ensaio. *Nota*: Sempre que se ensaiem herbicidas peroxidantes com dependência da luz, a iluminação laboratorial utilizada deve conter luz solar ultravioleta equivalente à presente na luz solar natural.

▼M7

10. O pH deve ser medido e adaptado ao meio de ensaio, conforme adequado. O controlo do pH do meio é particularmente importante, por exemplo, no caso dos ensaios com metais ou produtos químicos hidroliticamente instáveis. Para mais pormenores sobre o ensaio de produtos químicos cujas propriedades físico-químicas dificultam o ensaio, consultar o documento de orientações da OCDE (11).

VALIDADE DO ENSAIO

11. Para que os resultados do ensaio sejam válidos, o comprimento total médio dos rebentos e o peso fresco total médio dos rebentos nas plantas de controlo devem, pelo menos, duplicar durante a fase de exposição. Além disso, as plantas de controlo não devem apresentar quaisquer sintomas visuais de clorose e devem encontrar-se visivelmente livres de contaminação por outros organismos como algas e/ou películas bacterianas nas plantas, na superfície do sedimento e no meio de ensaio.

12. O coeficiente médio de variação do rendimento, com base em medições do peso fresco do rebento (ou seja, do início ao fim do ensaio), nas culturas de controlo, não deve exceder 35 % entre os replicados.

PRODUTO QUÍMICO DE REFERÊNCIA

13. Para verificar o desempenho do procedimento de ensaio ao longo do tempo, deve ensaiar-se periodicamente um ou mais produtos químicos de referência, como o 3,5-diclorofenol (3,5-DCP), utilizado no estudo interlaboratorial (9). Os dados do estudo interlaboratorial indicam que os valores médios de EC_{50} do 3,5-DCP para as diferentes variáveis de resposta se situavam entre 4,7 mg/l e 6,1 mg/l (ver o relatório do estudo interlaboratorial para informações sobre o intervalo de confiança previsto a partir destes valores). É aconselhável submeter a ensaio um produto químico de referência pelo menos duas vezes por ano ou, se os ensaios forem realizados com pouca frequência, em paralelo com os ensaios de toxicidade definitivos. O relatório estatístico do estudo interlaboratorial internacional apresenta um guia para os valores de EC_{50} previstos para 3,5-DCP (9).

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Equipamento de ensaio

14. O ensaio deve ser realizado em condições ambientais controladas, ou seja, numa câmara de crescimento, sala de crescimento ou laboratório, com fotoperíodo, iluminação e temperatura controláveis (ver secção «Condições de ensaio», pontos 56-58). As culturas de reserva devem ser conservadas separadamente dos recipientes de ensaio.

15. O estudo deve ser realizado com recipientes de ensaio de vidro, tais como aquários ou copos; costumam utilizar-se copos de vidro de 2 l (aproximadamente 24 cm de altura e 11 cm de diâmetro). Todavia, podem ser adequados outros recipientes (de maior dimensão), desde que a profundidade da água seja suficiente para permitir o crescimento ilimitado e manter as plantas submersas durante toda a duração do ensaio.

16. Como recipientes para incorporar as plantas no sedimento, podem utilizar-se vasos de plástico ou vidro, com cerca de 9 cm de diâmetro, 8 cm de altura e 500 ml de volume. Em alternativa, é possível utilizar copos de vidro, que são preferíveis em alguns casos (por exemplo, ensaio de produtos químicos hidrófobos ou com K_{ow} elevado).

17. A seleção das dimensões do vaso/copo deve ser ponderada a par da seleção dos recipientes de ensaio e da conceção de ensaio preferível — ver abaixo. Caso se utilize o ensaio A (um rebento por vaso com três vasos por recipiente) podem ser necessários vasos de menor dimensão ou recipientes de maior dimensão. Caso se utilize o ensaio B (três rebentos por vaso e um vaso por recipiente) a dimensão dos referidos vaso e recipiente deve ser adequada. Em todos os casos, a profundidade mínima de água sobreposta deve encontrar-se 12 cm acima do topo do sedimento e o rácio volume/superfície do sedimento para o volume/superfície da água deve ser registado.

▼M7

Organismo de ensaio

18. As abordagens gerais descritas no presente método de ensaio podem ser utilizadas para proceder ao ensaio de uma série de espécies de plantas aquáticas. Contudo, as condições descritas no presente método de ensaio foram adaptadas para o ensaio da espécie pinheirinha-de-água, *Myriophyllum spicatum*. Esta espécie pertence à família das dicotiledóneas, *Haloragaceae*.

19. A *Myriophyllum spicatum* (pinheirinha-de-água eurasiática) é uma espécie subaquática e enraizada que tolera um amplo conjunto de condições e se encontra em massas de água estáticas e correntes. A *M. spicatum* é uma planta perene que se reduz apenas à raiz no inverno. Normalmente, as plantas florescem e fixam sementes livremente, embora a propagação vegetativa através de botões complementares ou fragmentos de ramos que se separam naturalmente ou após perturbações seja muitas vezes o principal método de colonização.

Cultura do organismo de ensaio

20. As plantas podem ser obtidas de populações naturais ou através de fornecedores de plantas aquáticas. Em ambos os casos, a origem das plantas deve ser documentada e a identidade da espécie deve ser verificada. É necessário tomar precauções especiais para garantir que é obtida a espécie correta na recolha de *Myriophyllum spicatum* no campo, especialmente nas regiões em que esta é capaz de se cruzar com outras espécies de *Myriophyllum*. Em caso de dúvida, recomenda-se a utilização de culturas laboratoriais verificadas provenientes de fontes conhecidas. As plantas que tenham sido expostas a contaminantes químicos ou recolhidas de locais poluídos não devem ser utilizadas no presente ensaio.

21. Nas regiões em que a *M. spicatum* não se encontre prontamente disponível durante os meses de inverno, pode ser necessária a manutenção de culturas de reserva a longo prazo em condições laboratoriais ou em estufa. As culturas de reserva devem ser mantidas em condições semelhantes às condições de ensaio, embora seja possível reduzir a irradiação e a temperatura com vista a diminuir a frequência da manutenção das culturas (por exemplo, quando não estejam previstos ensaios em *Myriophyllum* durante um determinado período). Recomenda-se a utilização de aquários e vasos de maior dimensão do que a que seria utilizada nos ensaios, de modo a proporcionar espaço para a proliferação. A composição do sedimento e do meio aquático deve ser a mesma que a utilizada para os ensaios, embora seja possível adotar métodos alternativos de fertilização do sedimento (por exemplo, utilização de fórmulas fertilizantes comerciais de libertação lenta).

22. As plantas de reserva devem estar visivelmente livres de contaminação por quaisquer outros organismos, a saber, caracóis, algas filamentosas, fungos e insetos, por exemplo, ovos ou larvas da traça *Paraponyx stratiotata* e larvas ou adultos dos curculionídeos *Eubrychius velutus*. O enxaguamento do material vegetal em água fresca pode ser necessário para eliminar contaminações visíveis. Além disso, devem envidar-se esforços para minimizar o desenvolvimento de contaminação por algas unicelulares e bactérias, embora não seja necessária a esterilidade total do material vegetal. As culturas de reserva devem ser monitorizadas e transplantadas conforme necessário a fim de evitar o desenvolvimento de contaminação por algas ou bactérias. O arejamento das culturas de reserva pode ser benéfico caso a contaminação por algas ou bactérias se torne problemática.

23. Em todos os casos, as plantas são cultivadas/aclimatadas em condições semelhantes, mas não necessariamente idênticas, às utilizadas no ensaio durante um período adequado (ou seja, > 2 semanas) antes da sua utilização num ensaio.

24. As culturas de reserva em fase de floração não devem ser utilizadas nos ensaios, uma vez que, em geral, as taxas de crescimento vegetativo diminuem durante a após a fase de floração.

▼M7

Sedimento

25. Recomenda-se que sejam utilizados no presente ensaio sedimentos formulados com a seguinte composição, baseada na do sedimento artificial utilizado no capítulo C.28 do presente anexo 8. O sedimento é preparado conforme descrito no método de ensaio C.28, com a exceção da adição de nutrientes como descrito abaixo:

a) 4-5 % de turfa (peso seco, 2 ± 0,5 % de carbono orgânico) com pH tão próximo quanto possível de 5,5 a 6,0; é importante utilizar turfa na forma pulverulenta, finamente moída (de preferência, uma granulometria < 1 mm) e apenas seca ao ar.

b) 20 % (peso seco) de argila caulínica, de preferência com teor de caulinite superior a 30 %.

c) 75-76 % (peso seco) de areia quartzítica (com predominância de areia fina com mais de 50 % de partículas de granulometria compreendida entre 50 e 200 μm).

d) Adiciona-se um meio nutriente aquoso para que o lote de sedimento final contenha 200 mg/kg de sedimento seco de cloreto de amónio e fosfato de sódio e o teor de humidade da mistura final se encontre num intervalo de 30-50 %.

e) A quantidade de carbonato de cálcio ($CaCO_3$) quimicamente puro necessária para ajustar o pH da mistura final dos sedimentos a 7,0 ± 0,5.

26. As fontes da turfa, da argila caulínica e da areia devem ser conhecidas e documentadas. Caso a origem seja desconhecida ou acarrete algum nível de preocupação, os respetivos componentes devem ser verificados para determinar a ausência de contaminação química (por exemplo, metais pesados, compostos organoclorados, compostos organofosforados).

27. Os componentes secos do sedimento devem ser misturados de forma homogénea antes da mistura vigorosa da solução de nutrientes aquosa no sedimento. O sedimento húmido deve ser preparado pelo menos dois dias antes da utilização, a fim de permitir a imersão completa da turfa e prevenir a flutuação de partículas de turfa hidrófobas até à superfície quando o sedimento é sobreposto com o meio; antes da utilização, o sedimento húmido pode ser conservado ao abrigo da luz.

28. Para o ensaio, o sedimento é transferido para recipientes de dimensão adequada, tais como vasos de um diâmetro inferior ao dos recipientes de vidro (a superfície do sedimento deve cobrir aproximadamente 70 %, ou mais, da superfície do recipiente). Nos casos em que o recipiente tenha orifícios no fundo, um pedaço de papel de filtro no fundo do recipiente ajudará a manter o sedimento no mesmo. Enchem-se os vasos com o sedimento de modo a que a superfície deste esteja nivelada, antes da sua cobertura com uma camada fina (~ 2 a 3 mm) de um material inerte como areia ou gravilha fina de horticultura (ou coral esmagado), a fim de manter o sedimento no lugar.

Meio de ensaio

29. Recomenda-se o meio de Smart e Barko (12) para a cultura e o ensaio de *Myriophyllum spicatum*. A preparação deste meio é descrita no apêndice 1. Para um crescimento ótimo das plantas, o pH do meio (fase aquosa) no início do ensaio deve situar-se entre 7,5 e 8,0.

Conceção experimental

30. O ensaio deve integrar, no mínimo, seis recipientes de ensaio de replicados para o controlo não tratado e, no mínimo, quatro recipientes de ensaio de replicados para cada um de um mínimo de cinco níveis de concentração.

31. Caso não seja necessário determinar a NOEC, o ensaio poderá ser alterado de modo a aumentar o número de concentrações estudadas, reduzindo o número de replicados por concentração.

▼M7

32. Cada recipiente de ensaio representa um replicado com três rebentos. Existem duas opções para o cultivo de três rebentos em cada recipiente de ensaio:

— Ensaio A: um rebento por vaso e três vasos por recipiente.

— Ensaio B: três rebentos por vaso e um vaso por recipiente.

— São aceitáveis ensaios alternativos com um rebento por vaso por recipiente de ensaio, desde que a replicação seja ajustada conforme necessário a fim de atingir os critérios de validade exigidos.

33. Cada recipiente de ensaio deve ser repartido aleatoriamente pelos grupos de ensaio. A colocação aleatória dos frascos na zona de ensaio é necessária para reduzir ao mínimo a influência das diferenças espaciais em termos de intensidade da luz ou de temperatura.

Concentrações do produto químico em estudo e grupos de controlo

34. Em regra, as concentrações devem seguir uma progressão geométrica; o fator de separação entre as concentrações de ensaio não deve ser superior a 3,2. O conhecimento prévio da toxicidade do produto químico em estudo, determinada com base nos resultados de ensaios de determinação da gama de concentrações, permite uma mais fácil escolha das concentrações a utilizar no ensaio.

35. Para a determinação de uma EC_x, as concentrações de ensaio devem abranger a EC_x, de modo a garantir um nível de confiança apropriado. Por exemplo, para a determinação da EC_{50}, a concentração de ensaio mais elevada deve ser superior ao valor de EC_{50}. Se o valor de EC_{50} se situar fora da gama de concentrações ensaiadas, os intervalos de confiança associados serão maiores, o que poderá impossibilitar o ajustamento de um modelo estatístico. A utilização de mais concentrações de ensaio aumentará o intervalo de confiança relativo ao valor de EC_x resultante.

36. Para determinar a LOEC/NOEC (ponto final facultativo), a concentração mais baixa ensaiada deve ser suficientemente fraca para que o crescimento não seja significativamente diferente do crescimento nas plantas de controlo. Por outro lado, a concentração mais elevada a ensaiar deve ser suficientemente elevada para que o crescimento seja significativamente inferior ao do controlo. A utilização de mais replicados aumentará o poder estatístico da conceção concentração-sem efeito/ANOVA.

Ensaio no limite

37. Nos casos em que um ensaio de determinação da gama de concentrações indique que o produto químico em estudo não apresenta efeitos tóxicos em concentrações até 100 mg/l ou até ao seu limite de solubilidade no meio de ensaio, ou ainda, no caso de uma fórmula, até ao limite de capacidade de dispersão, pode proceder-se a um ensaio no limite para facilitar a comparação das respostas de um grupo de controlo e de um grupo exposto ao produto químico em estudo (a uma concentração de 100 mg/l ou que corresponda ao limite de solubilidade, ou de 1 000 mg/kg de sedimento seco). Este ensaio deve seguir os princípios gerais de um ensaio-padrão dose-resposta, com a exceção de se recomendar um aumento do número mínimo de replicados para seis recipientes de ensaio por controlo e concentração. O crescimento dos grupos de controlo e de exposição pode ser analisado através de um ensaio estatístico de comparação das médias, como, por exemplo, o teste t de Student.

Soluções de ensaio

38. Em geral, as soluções de ensaio são preparadas por diluição de uma solução de reserva, preparada através da dissolução ou dispersão do produto químico em meio de Smart e Barko, com água desmineralizada (ou seja, água destilada ou desionizada (ver apêndice 1).

▼M7

39. Regra geral, a concentração de ensaio mais elevada não deve exceder a solubilidade em água do produto químico em estudo ou, no caso de fórmulas, a capacidade de dispersão nas condições de ensaio.

40. No caso de produtos químicos com baixa solubilidade em água, poderá ser necessário preparar uma solução de reserva concentrada ou dispersar o produto por meio de um dispersante ou solvente orgânico, de modo a facilitar a adição de quantidades exatas do produto químico ao meio de ensaio e as suas dispersão e dissolução. Devem ser envidados todos os esforços para evitar utilizar solventes ou dispersantes desse tipo. A utilização de dispersantes ou de solventes auxiliares não deverá acarretar qualquer fitotoxicidade. A acetona e a dimetilformamida, por exemplo, incluem-se entre os solventes mais comuns que não causam fitotoxicidade em concentrações até 100 µl/l. Caso se utilize um solvente ou dispersante, a sua concentração final deve ser registada e reduzida ao mínimo (≤ 100 µl/l). Nestas circunstâncias, todos os tratamentos e controlos (do solvente) devem conter a mesma concentração de solvente ou dispersante. Os replicados do controlo não tratado que não contenham um solvente ou dispersante também são integrados no ensaio. Para mais orientações sobre a utilização de dispersantes, consultar o documento de orientação da OCDE (11).

PROCEDIMENTO DE ENSAIO

41. O procedimento de ensaio varia em função da via de aplicação do produto químico em estudo (ou seja, através da fase aquosa ou sedimentar). O comportamento provável do produto químico em estudo num sistema água-sedimento deve ser tido em conta para fundamentar a escolha do regime de exposição utilizado no ensaio (ou seja, renovação estática ou semiestática, água enriquecida ou sedimento enriquecido). Os ensaios com sedimento enriquecido podem ser preferíveis em alguns casos, no que se refere aos produtos químicos nos quais se prevê observar uma partição significativa no sedimento.

Fase de estabelecimento

42. São cortados das plantas de cultura ápices/pontas de rebentos saudáveis, ou seja, sem rebentos laterais, para obter rebentos com um comprimento de 6 cm (± 1 cm). Para o ensaio A (um rebento por vaso e três vasos por recipiente) uma única ponta do rebento é plantada em cada vaso. Para o ensaio B (três rebentos por vaso e um vaso por recipiente) quatro a cinco ápices do rebento são plantados em cada vaso com o sedimento.

43. Em ambos os casos devem ser plantados vasos adicionais para permitir a seleção de plantas uniformes no início do ensaio, bem como para proporcionar plantas de reserva a utilizar para a inspeção do crescimento de raízes imediatamente antes do tratamento e plantas de reserva a colher para medições da biomassa e do comprimento dos rebentos no dia 0.

44. Os rebentos são inseridos de modo a que cerca de 3 cm — cobrindo pelo menos dois nós — se encontrem abaixo da superfície do sedimento.

45. Subsequentemente, os vasos são transferidos para os recipientes de ensaio nas mesmas condições ambientais utilizadas na fase de exposição e conservados durante sete dias em meio de Smart e Barko para induzir o desenvolvimento das raízes.

46. Após este período, várias plantas dos vasos de reserva devem ser removidas para inspeção do crescimento das raízes. Caso o crescimento das raízes não seja visível (ou seja, as pontas das raízes não sejam visíveis), a fase de estabelecimento deve ser prorrogada até que o crescimento das raízes seja visível. Recomenda-se este passo a fim de garantir que as plantas se encontram em crescimento ativo no momento do início do ensaio.

▼M7

Seleção de material vegetal uniforme

47. No que se refere ao ensaio A (um rebento por vaso e três vasos por recipiente) os vasos são selecionados com base na uniformidade antes do início do ensaio. No caso do ensaio B (três rebentos por vaso e um vaso por recipiente), as plantas de reserva são removidas para deixar três plantas de dimensão e aspeto uniformes.

Exposição através da fase aquosa

48. Os vasos, selecionados com base na uniformidade, são colocados nos recipientes de ensaio, tal como exigido pela conceção experimental. O meio de Smart e Barko é então adicionado aos recipientes de ensaio. Devem tomar-se precauções para evitar perturbações do sedimento. Para este efeito, o meio pode ser adicionado com um funil ou um disco de plástico que cubra o sedimento enquanto o meio é vertido nos recipientes de ensaio, desde que o disco seja removido imediatamente depois. Em alternativa, os vasos das plantas podem ser colocados nos recipientes de ensaio após a adição do meio. Em ambos os casos, é possível utilizar um novo meio no início da fase de exposição, se necessário para minimizar a potencial acumulação de algas e bactérias ou para permitir a preparação de lotes únicos da solução de ensaio nos replicados.

49. Mede-se o comprimento do rebento acima do sedimento, quer antes quer depois da adição do meio.

50. As quantidades adequadas do produto químico em estudo podem ser adicionadas ao meio de ensaio antes da introdução deste nos recipientes de ensaio. Em alternativa, o produto químico em estudo pode ser introduzido no meio após a sua adição aos recipientes de ensaio. Neste caso, devem tomar-se precauções a fim de assegurar que o produto químico em estudo é distribuído de forma homogénea no sistema de ensaio sem perturbar o sedimento.

51. Em todos os casos, o aspeto (por exemplo, límpido, turvo, etc.) do meio é registado no início do ensaio.

Exposição através do sedimento

52. O enriquecimento dos novos sedimentos na concentração escolhida é efetuado por adição direta de uma solução do produto químico em estudo. Com o auxílio de um moinho de rolos ou de um misturador de alimentos — ou manualmente —, adiciona-se aos sedimentos formulados uma solução de reserva do produto químico em estudo, dissolvida em água desionizada. Se o produto químico for pouco solúvel em água, pode ser dissolvido num volume tão baixo quanto possível de um solvente orgânico adequado (por exemplo, hexano, acetona ou clorofórmio). Seguidamente, esta solução é misturada com cerca de 10 g de areia quartzítica fina por recipiente de ensaio. Deixa-se que o solvente se evapore e mistura-se a areia com a quantidade adequada de sedimento por copo de ensaio. Para solubilizar, dispersar ou emulsionar o produto químico em estudo apenas podem utilizar-se agentes de fácil volatilização. O volume/peso da areia enriquecida com o produto químico em estudo tem de ser tido em conta na preparação final do sedimento (o sedimento deve, pois, ser preparado com menos areia). Deve ter-se o cuidado de assegurar a distribuição total e uniforme do produto químico no sedimento.

53. Enchem-se os vasos com o sedimento enriquecido, como atrás descrito. As plantas, selecionadas com base na uniformidade e num sistema radicular adequado, são removidas dos vasos utilizados durante a fase de estabelecimento e transplantadas para o sedimento enriquecido como descrito acima.

54. Os vasos são colocados nos recipientes de ensaio, tal como exigido pela conceção experimental. Em seguida, adiciona-se cuidadosamente, com um funil, o meio de Smart e Barko, para evitar a perturbação do sedimento. Mede-se o comprimento do rebento acima do sedimento, quer antes ou depois da introdução do meio.

▼M7

Manutenção dos níveis de água ao longo da duração do ensaio

55. O volume de água final deve ser registado e o nível de água assinalado em cada recipiente de ensaio. Caso mais de 10 % da água se evapore durante o ensaio, o nível de água deve ser ajustado com água destilada. Se necessário, os copos podem ser tapados, mas não vedados, com uma cobertura transparente — como tampas de plástico —, para minimizar a evaporação e a contaminação por esporos de algas.

Condições de ensaio

56. Utiliza-se iluminação fluorescente com luz branca, quente e/ou fria, para proporcionar uma radiação luminosa na gama de aproximadamente 140 (± 20) $\mu E \cdot m^{-2}$ s^{-1}medida num comprimento de onda de fotossíntese (400--700 nm) à superfície da água, utilizando um ciclo de 16 horas de luz seguidas de 8 horas de escuridão. Quaisquer diferenças em relação à radiação luminosa selecionada na zona de ensaio não devem excede r o intervalo de ± 15 %.

57. A temperatura dos recipientes de ensaio é 20 ± 2 °C.

58. O pH do meio de controlo não deve aumentar mais de 1,5 unidades durante o ensaio. No entanto, um desvio superior a 1,5 unidades de pH não invalidará o ensaio quando se possa demonstrar que os critérios de validade previamente especificados são cumpridos.

Duração do ensaio

59. O período de exposição é de 14 dias.

Medições e determinações analíticas

60. Após a fase de estabelecimento e imediatamente antes do tratamento (ou seja, no dia 0), as plantas de reserva de cinco vasos selecionados aleatoriamente para o ensaio com três plantas por vaso ou 15 vasos para o ensaio com uma planta por vaso são colhidas para avaliação do comprimento do rebento, bem como do peso fresco e seco, como descrito abaixo.

61. No que diz respeito às plantas transferidas para a fase de exposição, são efetuadas as seguintes avaliações conforme demonstrado no quadro 1:

— Registam-se as medições do comprimento do rebento principal, o número de rebentos laterais e o comprimento dos rebentos laterais pelo menos no final do período de exposição (por exemplo, no dia 14).

— Registam-se as avaliações visuais da saúde da planta pelo menos três vezes durante o período de exposição (por exemplo, nos dias 0, 7 e 14).

— Efetuam-se medições do peso fresco e seco dos rebentos no final do ensaio (ou seja, no dia 14).

62. O comprimento dos rebentos é determinado com uma régua. Caso existam rebentos laterais, também devem registar-se os seus números e o respetivo comprimento.

63. As avaliações visuais da saúde das plantas são efetuadas através do registo do aspeto das plantas e da condição geral do meio de ensaio. As observações a registar incluem o seguinte:

— necrose, clorose ou outra descoloração como vermelhidão excessiva em relação às plantas de controlo;

— contaminação por bactérias ou algas;

— anomalias de crescimento, como crescimento incompleto, alterações na distância entre os nós, folhas/rebentos distorcidos, proliferação de rebentos laterais, perda de folhas, perda de turgescência e fragmentação do caule;

▼M7

— as avaliações visuais da saúde das raízes são efetuadas no final do ensaio, após uma lavagem cuidadosa para retirar o sedimento das raízes a fim de permitir a observação do sistema radicular. Apresenta-se em seguida uma proposta de escala para a avaliação, por comparação com as plantas de controlo:

1) ausência de raízes

2) poucas raízes

3) desenvolvimento moderado da raiz

4) desenvolvimento muito bom da raiz, semelhante aos controlos

64. As determinações do peso fresco são efetuadas no início e no final do ensaio através do corte do rebento ao nível do sedimento e da subsequente secagem com papel antes da pesagem. Devem tomar-se precauções para remover as partículas de sedimento suscetíveis de aderir à base do rebento. Em seguida, o material do rebento é colocado numa estufa de secagem a cerca de 60 °C para secagem até um peso constante, antes da nova pesagem e do registo do peso seco.

65. O quadro 1 apresenta um resumo das avaliações biológicas mínimas exigidas ao longo da duração do ensaio.

Quadro 1

Calendário de avaliação

Dia após tratamento (DAT)	*Myriophyllum spicatum*			
	Comprimento do rebento, comprimento e número dos rebentos laterais	Avaliação visual dos rebentos	Peso fresco e seco dos rebentos, Avaliação visual das raízes	pH O_2
0	A	A	A	A
4	—	—	-	—
7	—	A	-	A
14	A	A	A	A

A: indica que são necessárias avaliações nestas ocasiões
—: indica que não são necessárias medições

Frequência das medições e determinações analíticas

66. Deve registar-se diariamente a temperatura do meio contido num frasco suplementar mantido nas mesmas condições na câmara de crescimento, incubadora ou sala utilizada para o ensaio (ou continuamente com um registador de dados).

67. O pH e a concentração do oxigénio dissolvido do meio de ensaio devem ser verificados no início do mesmo, pelo menos uma vez durante o estudo e no final deste, em todos os replicados. Em cada ocasião, as medições devem ser efetuadas na mesma altura do dia. Caso se utilizem soluções a granel para preparar todos os replicados em cada concentração de ensaio, é aceitável uma única medição de cada solução a granel no dia 0.

68. Deve medir-se a irradiância na câmara de crescimento, na incubadora ou na sala, em pontos equivalentes ao nível da superfície da água. As medições deverão ser efetuadas pelo menos uma vez no início do ensaio ou durante o mesmo. O método de deteção e medição da luz e, em particular, o tipo de sensor utilizado, afetarão o valor medido. Os sensores esféricos (que reagem à luz proveniente de todos os ângulos acima e abaixo do plano de medição)

▼M7

e os sensores «de cosseno» (que respondem à luz proveniente de todos os ângulos acima do plano de medição) são preferíveis aos sensores unidirecionais e fornecem leituras mais elevadas para as fontes múltiplas de luz do tipo aqui descrito.

Determinações analíticas do produto químico em estudo

69. A aplicação correta do produto químico em estudo deve ser fundamentada por determinações analíticas das concentrações do produto químico em estudo.

70. Devem ser colhidas amostras de água para análise química pouco depois do início do ensaio (ou seja, no dia de aplicação, para produtos químicos em estudo estáveis, ou uma hora após a aplicação, para produtos químicos que não sejam estáveis), bem como no final do mesmo, para todas as concentrações de ensaio.

71. As concentrações no sedimento e nas águas capilares deste devem ser determinadas no início do ensaio e no final do mesmo, pelo menos na concentração de ensaio mais elevada, a menos que se saiba que os produtos químicos em estudo são estáveis em água (> 80 % da concentração nominal). Pode não ser necessário efetuar medições nos sedimentos e nas águas capilares, caso a partição do produto químico em estudo entre a água e os sedimentos tenha sido claramente determinada num estudo água/sedimento em condições comparáveis (por exemplo, coeficiente de partição sedimento/ /água, método de aplicação, tipo de sedimento).

72. A amostragem do sedimento no início do ensaio é passível de perturbar o sistema. Assim, pode ser necessário um número adicional de recipientes de ensaio tratados a fim de facilitar as determinações analíticas no início e no final do ensaio. Do mesmo modo, sempre que se considere necessária a realização de avaliações intermédias — ou seja, no dia 7 — e as análises exijam grandes amostras de sedimento impossíveis de remover facilmente do sistema de ensaio, as determinações analíticas devem ser executadas com recipientes de ensaio adicionais tratados da mesma forma que os utilizados para as avaliações biológicas.

73. Recomenda-se a centrifugação, por exemplo, a 10 000 g e 4 °C durante 30 minutos, com vista a isolar a água intersticial. No entanto, a filtragem também é aceitável, se se demonstrar que o produto químico em estudo não é absorvido pelos filtros. Em alguns casos, se a amostra for demasiado pequena, poderá não ser possível analisar as concentrações da água capilar.

74. Nos ensaios semiestáticos (ou seja, exposição através da fase aquosa) em que não se preveja que a concentração do produto ou produtos químicos relevantes permaneça no intervalo de 20 % da concentração nominal ao longo da duração do ensaio sem renovação das soluções de ensaio, devem recolher-se amostras das soluções usadas e preparadas de fresco para análises da concentração do produto químico em estudo em cada renovação.

75. Nos casos em que a concentração inicial medida do produto químico em estudo não se encontre no intervalo de 20 % do valor nominal, mas em que se possam fornecer provas suficientes de que as concentrações iniciais são reprodutíveis e estáveis (isto é, se mantêm dentro da gama 80-120 % das concentrações iniciais), as determinações químicas podem ser limitadas às concentrações maior e menor usadas no ensaio.

76. Em todos os casos, a determinação das concentrações do produto químico em estudo só precisa de ser efetuada no recipiente de um dos replicados, para cada concentração de ensaio. Em alternativa, as soluções de ensaio de todos os replicados para cada concentração podem ser agrupadas para análise.

77. Se existirem provas de que a concentração do produto químico em estudo não variou mais de 20 % ao longo do ensaio relativamente ao valor da concentração nominal ou da concentração inicial medida, a análise dos resultados e a subsequente obtenção de pontos finais podem basear-se nos valores nominais ou iniciais medidos.

▼M7

78. Nestes casos, as concentrações com efeitos devem basear-se em concentrações nominais ou medidas na água no início do ensaio.

79. Todavia, caso existam indícios de que a concentração diminuiu ao longo do ensaio — ou seja, não se manteve no intervalo de 20 % da concentração nominal ou inicial medida no compartimento tratado —, a análise dos resultados deve basear-se na média geométrica da concentração durante a exposição ou em modelos que descrevam a diminuição da concentração do produto químico em estudo no compartimento tratado (11).

AVALIAÇÃO DOS DADOS

80. Nos casos em que seja necessária a utilização de um solvente/dispersante, os dados dos controlos sem tratamento e com o solvente podem ser agrupados para efeitos de análise estatística, desde que as respostas dos controlos sem tratamento e com o solvente não sejam significativamente diferentes em termos estatísticos.

Variáveis de resposta

81. O objetivo do ensaio consiste em determinar os efeitos do produto químico em estudo no crescimento vegetativo da espécie de ensaio, mediante a utilização de duas variáveis de resposta, a taxa média de crescimento específico e o rendimento, do seguinte modo:

Taxa média de crescimento específico

82. Esta variável de resposta baseia-se em alterações nos logaritmos do comprimento total do rebento, no peso fresco total do rebento e no peso seco total do rebento, ao longo do tempo, nos controlos e em cada grupo de exposição. É calculada para cada um dos replicados de cada grupo de controlo e de exposição. O peso e o comprimento médios das três plantas por recipiente de ensaio (replicado) e, subsequentemente, a taxa de crescimento para cada replicado, são calculados pela seguinte fórmula:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

em que:

μ_{i-j}: taxa média de crescimento específico entre o momento i e o momento j

N_i: variável de medição no recipiente de ensaio ou de controlo no momento i

N_j: variável de medição no recipiente de ensaio ou de controlo no momento j

t: período decorrido entre i e j

83. A partir dos valores dos replicados, calcula-se um valor médio da taxa de crescimento, associado às respetivas estimativas da variância para cada um dos grupos de exposição e de controlo.

84. Calcula-se a taxa média de crescimento específico para a totalidade do período de ensaio (na fórmula acima, «i» é o momento inicial e «j» o momento final do ensaio). Para cada uma das concentrações de ensaio e de controlo, calcular o valor médio da taxa média de crescimento específico, associado às respetivas estimativas da variância.

▼M7

85. A percentagem de inibição da taxa de crescimento (I_r) pode então ser calculada para cada concentração de ensaio (grupos expostos), de acordo com a seguinte fórmula:

$$\%I_r = \frac{(\mu_C - \mu_T)}{\mu_C} \times 100$$

em que:

% Ir: inibição percentual da taxa média de crescimento específico

μC: valor médio de μ no controlo

μT: valor médio de μ no grupo de tratamento

Rendimento

86. Esta variável de resposta baseia-se em alterações ao longo do tempo no comprimento total, no peso fresco total e no peso seco total do rebento, nos controlos e em cada grupo exposto. Para cada grupo exposto, a percentagem média de inibição do rendimento (% Iy) é calculada do seguinte modo:

$$\%I_y = \frac{(b_C - b_T)}{b_C}$$

em que:

% I_y: redução percentual do rendimento

b_C: biomassa final menos biomassa inicial do grupo de controlo

b_T: biomassa final menos biomassa inicial do grupo exposto

Representação gráfica das curvas concentração-resposta

87. Devem representar-se as curvas de concentração-resposta, que relacionam a percentagem média de inibição da variável de resposta (I_r, ou I_y), calculadas como se indica acima, com o logaritmo da concentração do produto químico em estudo.

Estimativa da EC_x

88. As estimativas da EC_x (p. ex.: EC_{50}) devem basear-se tanto na taxa média de crescimento específico (E_rC_x) como no rendimento (E_yC_x), devendo cada uma dessas medidas, por seu turno, basear-se no peso fresco total, no peso seco total e no comprimento total do rebento.

89. Cabe aqui notar que os valores de EC_x calculados através destas duas variáveis de resposta não são comparáveis e que a diferença entre esses valores é reconhecida para efeitos da utilização dos resultados do ensaio. Os valores de EC_x baseados na taxa média de crescimento específico (E_rC_x) são, na maioria dos casos, mais elevados do que os resultados baseados no rendimento (E_yC_x) — se forem seguidas as condições de ensaio apresentadas no presente método de ensaio — devido à base matemática das respetivas abordagens. Esta diferença não deve ser interpretada como uma diferença de sensibilidade entre as duas variáveis de resposta, mas simplesmente como uma diferença matemática entre os valores.

Procedimentos estatísticos

90. O objetivo consiste em descrever a relação concentração-resposta de forma quantitativa, por análise de regressão Pode utilizar-se uma regressão linear ponderada, antecedida de uma transformação de linearização dos dados de resposta, p. ex., para unidades probit, logit ou de Weibull (13), mas a técnica preferida é o recurso a procedimentos de regressão não linear, que permitem lidar melhor com as inevitáveis irregularidades dos dados e com os desvios relativamente a uma boa distribuição. Nas zonas próximas da inibição nula ou total, essas irregularidades podem ser aumentadas pela transformação, o

▼M7

que irá interferir com a análise (13). Cabe aqui notar que os métodos padrão de análise que utilizam os transformados probit, logit ou de Weibull se destinam à análise de dados quantais (por exemplo, mortalidade ou sobrevivência), pelo que terão de ser alterados para lidar com os dados relativos à taxa de crescimento ou ao rendimento. Alguns métodos para a determinação dos valores de EC_x a partir de dados contínuos podem ser consultados em (14), (15), (16) e (17).

91. Para cada uma das variáveis de resposta em análise, utilizar a relação concentração-resposta para estimar os valores pontuais de EC_x. São determinados os intervalos de confiança de 95 % para cada estimativa, devendo avaliar-se a adequação do ajustamento da curva pelo modelo de regressão aos dados de resposta, graficamente ou por métodos estatísticos. A análise por regressão deve utilizar os valores de cada replicado e não o valor médio para cada grupo exposto.

92. As estimativas da EC_{50} e os respetivos intervalos de confiança podem também ser obtidos utilizando uma interpolação linear com *bootstrapping* (18), quando os modelos/métodos de regressão disponíveis não forem aplicáveis aos dados existentes.

93. Para a estimativa da LOEC e, portanto, da NOEC, será necessário comparar as médias dos recipientes expostos, utilizando técnicas de análise da variância (ANOVA). A média para cada concentração é então comparada com a média observada nos controlos, utilizando um método adequado (p. ex., os testes de Dunnet ou de Williams) (19) (20) (21) (22). É necessário verificar o cumprimento do pressuposto de distribuição normal (ND) e homogeneidade da variância (VH) das análises ANOVA. Esta avaliação deve ser realizada por recurso ao teste de Shapiro-Wilks (ND) ou ao teste de Levene (VH). O incumprimento do pressuposto de distribuição normal e homogeneidade das variâncias pode por vezes ser corrigido através da transformação logarítmica dos dados. Caso a heterogeneidade da variância e/ou o desvio da distribuição normal sejam extremos e não possam ser corrigidos por transformação, deve ponderar-se a análise com recurso a métodos como o teste t de Bonferroni-Welch, o método degressivo de Jonkheere-Terpstra e o teste de comparação de médias de Bonferroni. Para mais orientações sobre a determinação da NOEC, consultar a referência (16).

RELATÓRIOS

94. O relatório do ensaio inclui os seguintes dados:

Produto químico em estudo

Substância monocomponentes:

— aspeto físico, solubilidade em água e outras propriedades físico-químicas relevantes;

— dados de identificação química, como as denominações IUPAC ou CAS, número CAS, código SMILES ou InChI, fórmula estrutural, pureza, identidade química de impurezas, caso se justifique e seja exequível, etc.

Substância multicomponentes, UVCB e misturas:

— caracterizada, na medida do possível, pela identidade química (ver acima), ocorrência quantitativa e propriedades físico-químicas relevantes dos componentes.

Espécie de ensaio

— nome científico e fonte.

Condições de ensaio

— duração e condições da fase de estabelecimento;

— procedimento de ensaio utilizado (estático, semiestático, pulsado);

▼M7

— data de início do ensaio e respetiva duração;

— meio de ensaio, ou seja, sedimento e meio nutriente líquido;

— descrição do método experimental: sala/câmara de crescimento ou laboratório, recipientes de ensaio e tampas, volumes da solução, comprimento e peso das plantas de ensaio por recipiente de ensaio no início do ensaio, rácio da superfície do sedimento para a superfície de água, rácio do volume do sedimento e da água;

— concentrações de ensaio (nominais ou medidas, conforme apropriado) e número de replicados por concentração;

— métodos de preparação das soluções de reserva e de ensaio, incluindo a eventual utilização de solventes ou dispersantes;

— temperatura durante o ensaio;

— fonte luminosa, irradiância ($\mu E \cdot m^{-2}\ s^{-1}$)

— os valores pH dos meios de controlo e de ensaio, bem como o aspeto dos meios de ensaio no início e no final do ensaio;

— concentrações de oxigénio;

— o método de análise, juntamente com os dados adequados à avaliação da qualidade do método (estudos de validação, desvios-padrão ou intervalos de confiança das análises);

— métodos de determinação de variáveis de medição, p. ex., comprimento, peso seco, peso fresco;

— todos os desvios em relação ao presente método de ensaio.

Resultados

— dados brutos: comprimento dos rebentos e peso dos rebentos das plantas/ /dos vasos e outras variáveis de medição em cada recipiente de controlo e de ensaio em cada observação e momento de realização de análises de acordo com o calendário de avaliação apresentado no quadro 1;

— médias e desvios-padrão para cada variável de medição;

— curvas de crescimento para cada concentração;

— tempo de duplicação/taxa de crescimento no controlo com base no comprimento e no peso fresco do rebento incluindo o coeficiente de variação de rendimento do peso fresco;

— variáveis de resposta calculadas para cada replicado exposto, com os respetivos valores médios, e coeficiente de variação dos replicados;

— representação gráfica da relação concentração/efeito;

— estimativas dos pontos finais de toxicidade para as variáveis de resposta, p. ex. EC_{50}, e os intervalos de confiança associados. Se forem calculados, valores da LOEC e/ou da NOEC e métodos estatísticos utilizados para a respetiva determinação;

— Caso tenha sido efetuada uma análise ANOVA, dimensão do efeito detetado (por exemplo, diferença significativa mínima).

— ocorrência de estimulação do crescimento que tenha sido verificada em qualquer dos grupos expostos;

▼M7

— sinais visuais de fitotoxicidade, bem como quaisquer observações em relação às soluções de ensaio;

— discussão dos resultados, incluindo qualquer influência nos resultados do ensaio decorrente de alterações do presente método de ensaio.

REFERÊNCIAS

(1) Capítulo C.26 do presente anexo*: Ensaio de inibição de crescimento com Lemna sp*.

(2) Capítulo C.3 do presente anexo: Algas e cianobactérias de água doce — Ensaio de inibição do crescimento.

(3) Maltby, L. et al. (2010), Aquatic Macrophyte Risk Assessment for Pesticides, Guidance from the AMRAP Workshop in Wageningen (NL), 14-16 janeiro de 2008.

(4) Arts, G.H.P. et al. (2008), Sensitivity of submersed freshwater macrophytes and endpoints in laboratory toxicity tests, Environmental Pollution, Vol. 153, pp. 199-206.

(5) ISO 16191:2013 Water quality — Determination of the toxic effect of sediment on the growth behaviour of Myriophyllum aquaticum.

(6) Knauer, K. et al. (2006), Methods for assessing the toxicity of herbicides to submersed aquatic plants, Pest Management Science, Vol. 62/8, pp. 715--722.

(7) Capítulo C.50 do presente anexo: Ensaio de toxicidade em *Myriophyllum spicatum* sem sedimentos.

(8) Capítulo C.28 do presente anexo: Ensaio de toxicidade em quironomídeos num sistema sedimento-água com água enriquecida.

(9) Ratte, M., H. Ratte (2014), «Myriophyllum Toxicity Test: Result of a ring test using *M. aquaticum* and *M. spicatum* grown in a water-sediment system», OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, n.º 206, OECD Publishing, Paris.

(10) Davies, J. et al. (2003), Herbicide risk assessment for non-target aquatic plants: sulfosulfuron — a case study, Pest Management Science, Vol. 59/2, pp. 231-237.

(11) OCDE (2000), «Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures», OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, n.º 23, OECD Publishing, Paris.

(12) Smart, R.M., J.W. Barko (1985), Laboratory culture of submersed freshwater macrophytes on natural sediments, Aquatic Botany, Vol. 21/3, pp. 251--263.

(13) Christensen, E.R., N. Nyholm (1984), Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves, Environmental Science Technology, Vol. 18/9, pp. 713-718.

(14) Nyholm, N. et al. (1992), Statistical treatment of data from microbial toxicity tests, Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 11/2, pp. 157--167.

(15) Bruce, R.D., D.J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 11/10, 1485-1494.

(16) OCDE (2006), «Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application», OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, n.º 54, OECD Publishing, Paris.

(17) Brain, P., R. Cousens (1989), An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses, Weed Research, Vol. 29/2, pp. 93-96.

▼**M7**

(18) Norberg-King, T.J. (1988), An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach, National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. US EPA, Duluth, MN.

(19) Dunnett, C.W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, Journal of the American Statistical Association, Vol. 50/272, pp. 1096-1121.

(20) Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, Biometrics, Vol. 20/3, pp. 482-491.

(21) Williams, D.A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, Biometrics, Vol. 27/1, pp. 103-117.

(22) Williams, D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, Biometrics, Vol. 28/2, pp. 519-531.

▼**M7**

Apêndice 1

COMPOSIÇÃO DO MEIO DE SMART E BARKO

Componente	Quantidade de reagente adicionada à água (*) (mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	91,7
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	69,0
$NaHCO_3$	58,4
$KHCO_3$	15,4
pH (em equilíbrio com o ar)	7,9

(*) água desmineralizada (destilada ou desionizada)

▼M7

Apêndice 2

DEFINIÇÕES

Biomassa: peso fresco e/ou seco da matéria viva presente numa população. No presente ensaio, a biomassa é constituída pela soma do rebento principal, de todos os ramos laterais e de todas as raízes.

Produto químico: uma substância ou mistura.

Clorose: a alteração de cor de verde para o amarelecimento do organismo de ensaio, em especial dos verticilos.

Ecx: concentração do produto químico em estudo dissolvido no meio de ensaio que resulta numa redução de x % (por exemplo, 50 %) no crescimento de *Myriophyllum spicatum* num determinado período de exposição (que deverá ser explicitamente mencionado nos casos em que se afaste da duração total ou normal do ensaio). A fim de indicar de forma inequívoca se o valor de EC se refere à taxa de crescimento ou ao rendimento, o símbolo «E_rC» é utilizado no primeiro caso e o símbolo «E_yC» no segundo, sendo seguidos da designação da variável de medição utilizada, por exemplo, E_rC (comprimento do rebento principal).

Crescimento: aumento da variável de medição, por exemplo, comprimento do rebento principal, comprimento total dos ramos laterais, comprimento total do rebento, comprimento total da raiz, peso fresco, peso seco ou número de verticilos, no período de ensaio.

Taxa de crescimento (taxa média de crescimento específico): aumento logarítmico da variável de medição durante o período de exposição. *Nota*: As variáveis de resposta relacionadas com a taxa de crescimento são independentes da duração do ensaio desde que o padrão de crescimento dos organismos de controlo não expostos seja exponencial.

Menor concentração com efeito observável (LOEC): concentração mais baixa à qual se observa que o produto químico em estudo tem um efeito estatisticamente significativo ($p < 0,05$) de redução do crescimento, quando comparada com o controlo, para um determinado período de exposição. No entanto, todas as concentrações de ensaio superiores à LOEC devem ter um efeito prejudicial igual ou superior ao verificado com a LOEC. Quando estas duas condições não puderem ser satisfeitas, deverá ser fornecida uma explicação pormenorizada sobre a forma como se determinou a LOEC (e, consequentemente, a NOEC).

Variáveis de medição: qualquer tipo de variável que seja medida para permitir a determinação do ponto final do ensaio, utilizando uma ou mais variáveis de resposta. No presente método de ensaio, o comprimento do rebento principal, o comprimento total dos ramos laterais; o comprimento total do rebento, o comprimento total da raiz, o peso fresco, o peso seco e o número de verticilos são variáveis de medição.

Monocultura: cultura com uma única espécie de planta.

Necrose: tecido morto (ou seja, branco ou castanho escuro) do organismo de ensaio.

Concentração sem efeitos observáveis (NOEC): a concentração de ensaio imediatamente inferior à LOEC.

Variável de resposta: uma variável de estimativa da toxicidade, derivada de qualquer das variáveis medidas que descrevem a biomassa nos diferentes métodos de cálculo. No presente método de ensaio, a taxa de crescimento e o rendimento são variáveis de resposta derivadas de variáveis de medição como o comprimento do rebento principal, o comprimento total do rebento, o peso fresco, o peso seco ou o número de verticilos.

Ensaio semiestático (com renovação): ensaio em que a solução de ensaio é periodicamente substituída, em momentos específicos do ensaio.

Ensaio estático: ensaio durante o qual não há renovação da solução de ensaio.

▼M7

Produto químico em estudo: qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado o presente método de ensaio.

Ponto final do ensaio: descreve, em termos gerais, o fator que será alterado pelo produto químico em estudo, por comparação com o controlo, e cuja identificação é o objetivo do ensaio. No presente método, o ponto final é a inibição do crescimento, que pode ser expressa por diferentes variáveis de resposta, baseadas em uma ou mais variáveis de medição.

Meio de ensaio: meio sintético completo de crescimento em que as plantas de ensaio são cultivadas quando expostas ao produto químico em estudo. Em geral, o produto químico em estudo é dissolvido no meio de ensaio.

UVCB: uma substância de composição desconhecida ou variável, produto de reação complexo ou material biológico.

Rendimento: valor de uma variável de medição que exprime a diferença entre a biomassa no final do período de exposição e o valor dessa variável de medição no início do período de exposição. Nota: Quando o padrão de crescimento dos organismos não expostos é exponencial, as variáveis de resposta com base no rendimento diminuirão ao longo do ensaio.

▼M8

C.52. ENSAIO ALARGADO DE REPRODUÇÃO NUMA GERAÇÃO EM PEIXE DO ARROZ-JAPONÊS (MEOGRT)

INTRODUÇÃO

1. O presente método de ensaio é equivalente às orientações de ensaio 240 da OCDE (2015). Trata-se de um método de ensaio completo baseado na exposição de peixes ao longo de várias gerações, que visa obter dados passíveis de serem utilizados para avaliar os perigos e os riscos para o ambiente associados aos produtos químicos, nomeadamente produtos suspeitos de serem desreguladores endócrinos. A exposição no ensaio MEOGRT prolonga-se até à eclosão (até duas semanas pós-fecundação – «spf») na segunda geração (F2). Seriam necessárias investigações complementares para justificar a utilidade de um eventual prolongamento da geração F2 para além da eclosão; as informações atualmente disponíveis não fornecem condições nem critérios que justifiquem prolongar a geração F2. No entanto, o método pode ser atualizado à medida que forem surgindo novos dados e informações a ter em conta. Por exemplo, podem ser úteis, em determinadas circunstâncias, orientações para a extensão da geração F2 até à reprodução (por exemplo, no caso de produtos químicos com um elevado potencial de bioconcentração ou de indícios de efeitos transgeracionais noutras taxa). O método pode ser utilizado para avaliar potenciais efeitos crónicos dos produtos químicos – incluindo produtos químicos suscetíveis de terem efeitos desreguladores do sistema endócrino –, nos peixes. Enfatiza potenciais efeitos pertinentes ao nível da população (nomeadamente impactos negativos na sobrevivência, no desenvolvimento, no crescimento e na reprodução), a fim de calcular uma concentração sem efeitos observáveis (NOEC) ou uma concentração efetiva a × % (CEx), embora se deva notar que as abordagens do tipo CEx raramente são adequadas para estudos de grande dimensão deste tipo, em que o aumento do número de concentrações de ensaio a fim de determinar a CEx desejada pode ser inviável e causar problemas significativos em termos de bem-estar animal devido ao elevado número de indivíduos utilizados. Para produtos químicos que não exijam uma avaliação ao longo de várias gerações ou que não sejam potenciais desreguladores endócrinos, pode ser mais adequado recorrer a outros métodos de ensaio (1). O peixe-do-arroz-japonês é a espécie adequada para utilização no presente método de ensaio, dado o seu ciclo de vida curto e a possibilidade de determinar o sexo genético (2), que é considerado um componente crítico do método. Os procedimentos e os parâmetros específicos descritos são aplicáveis apenas ao peixe-do-arroz-japonês. Outras espécies de peixes de pequena dimensão (por exemplo, peixe-zebra) podem ser adaptadas a um protocolo de ensaio semelhante.

2. O presente método de ensaio mede vários parâmetros biológicos. Trata-se, em primeiro lugar, de enfatizar os potenciais efeitos nocivos nos parâmetros pertinentes em termos das populações, incluindo a sobrevivência, o desenvolvimento visível, o crescimento e a reprodução. Em segundo lugar, para fornecer informações mecanísticas e estabelecer ligações entre os resultados de outros tipos de estudos de campo e laboratoriais que proporcionem provas *a posteriori* de uma atividade potencialmente desreguladora do sistema endócrino (por exemplo, atividade androgénica ou estrogénica noutros testes e ensaios), obtêm-se outras informações úteis medindo o ARN mensageiro da *vitelogenina* (ARNm *vtg*) – ou a proteína vitelogenina, VTG –, determinando as características sexuais secundárias (CSS) fenotípicas relacionadas com o sexo genético e procedendo a uma avaliação histopatológica. Note-se que, se um produto químico em estudo ou os seus metabolitos não forem suspeitos de serem perturbadores endócrinos, pode não ser necessário medir estes parâmetros secundários e ser mais adequado realizar estudos que exijam uma quantidade inferior de recursos e de animais (1). As definições utilizadas no presente método de ensaio constam do apêndice 1.

▼M8

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES

3. Devido ao número limitado de produtos químicos testados e de laboratórios envolvidos na validação do presente método de ensaio, bastante complexo, prevê-se que, quando estiver disponível um número suficiente de estudos para determinar o impacto desta nova conceção, o método seja reexaminado e, se necessário, atualizado à luz da experiência adquirida. Os dados podem ser utilizados ao nível 5 do Quadro Conceptual da OCDE para o Ensaio e a Avaliação de Desreguladores Endócrinos (3). O ensaio inicia-se com a exposição de peixes adultos (geração F0) ao produto químico em estudo durante a fase de reprodução. A exposição prossegue durante as fases de desenvolvimento e de reprodução na geração F1 e durante a fase de eclosão na geração F2; deste modo, o ensaio permite avaliar as vias endócrinas, tanto estruturais como ativacionais. Na interpretação dos parâmetros medidos a nível endócrino, pode aplicar-se uma abordagem baseada na análise do peso da prova.

4. O ensaio deve incluir um número de indivíduos suficiente para a avaliação dos parâmetros relativos à reprodução (ver apêndice 3), assegurando que esse número seja o mínimo necessário, por razões de bem-estar animal. Tendo em conta o elevado número de animais utilizados, é importante ponderar atentamente a necessidade de realizar o ensaio em função dos dados de que se disponha, os quais podem já conter informações pertinentes sobre muitos dos parâmetros medidos no ensaio MEOGRT. O documento da OCDE sobre o quadro de ensaio da toxicidade nos peixes pode auxiliar neste sentido (1).

5. O método de ensaio foi concebido essencialmente para distinguir os efeitos de uma única substância. No entanto, se for necessário realizar o ensaio de uma mistura, convém verificar se os resultados serão aceitáveis para a finalidade regulamentar pretendida.

6. Antes do início do ensaio, é importante dispor de informações sobre as propriedades físico-químicas do produto químico em estudo, nomeadamente para garantir a estabilidade das soluções químicas produzidas. É igualmente necessário dispor de um método analítico suficientemente sensível para verificar as concentrações do produto químico em estudo.

PRINCÍPIO DO ENSAIO

7. O ensaio começa pela exposição de machos e fêmeas sexualmente maduros (pelo menos 12 spf) em casais reprodutores, durante três semanas, no decurso as quais o produto químico em estudo é distribuído no organismo da geração parental (F0) de acordo com o respetivo comportamento toxicocinético. Os ovos são recolhidos o mais próximo possível do primeiro dia da quarta semana para iniciar a geração F1. Durante a criação da geração F1 (15 semanas no total), são avaliadas a taxa de eclosão e a sobrevivência. Além disso, os peixes são recolhidos às 9-10 spf para a medição dos parâmetros de desenvolvimento e a desova é avaliada durante três semanas, da spf 12 até à 14. A geração F2 é iniciada após a terceira semana de avaliação da reprodução e criada até ao final da eclosão.

CRITÉRIOS DE VALIDADE DO ENSAIO

8. São aplicáveis os seguintes critérios de validade do ensaio:

— A concentração de oxigénio dissolvido deve ser ≥ 60 % do valor da saturação no ar durante todo o ensaio;

— A temperatura média da água ao longo de todo o estudo deve situar-se entre 24 e 26 °C. Eventuais afastamentos de curta duração relativamente à média em determinados aquários não devem ser superiores a 2 °C;

▼M8

— A fecundidade média dos controlos em cada geração (F0 e F1) deve ser superior a 20 ovos por casal e por dia. A fertilidade de todos os ovos produzidos durante a avaliação deve ser superior a 80 %. Além disso, 16 dos 24 casais reprodutores de controlo recomendados (> 65 %) devem produzir mais de 20 ovos por casal e por dia;

— A taxa de eclosão dos ovos deve ser ≥ 80 % (em média) nos controlos (em cada uma das gerações F1 e F2);

— A sobrevivência após a eclosão até 3 spf e a partir de 3 spf até à eutanásia, para a geração F1 (ou seja, 15 spf), deve ser ≥ 80 % (em média) e ≥ 90 % (em média), respetivamente, nos controlos (F1);

— Os dados disponíveis devem demonstrar que as concentrações do produto químico em estudo dissolvido foram corretamente mantidas num intervalo de ± 20 % em relação à média dos valores medidos.

No que diz respeito à temperatura da água, embora não se trate de um critério de validade, os replicados no âmbito de um tratamento, assim como os grupos de tratamento no âmbito do ensaio, não devem diferir estatisticamente uns dos outros (atendendo às temperaturas medidas diariamente e excluindo eventuais afastamentos de curta duração).

9. Embora se possa observar uma diminuição da reprodução nos grupos expostos às concentrações mais elevadas, a reprodução deve ser suficiente, para encher as eclosoras, pelo menos no terceiro grupo mais exposto e em todos os grupos menos expostos da geração F0. Além disso, a sobrevivência embrionária no terceiro grupo mais exposto e nos grupos menos expostos da geração F1 deve permitir avaliar os parâmetros medidos aquando da amostragem subadulta (ver pontos 36 e 38 do apêndice 9). Além disso, deve-se observar pelo menos uma taxa mínima de sobrevivência pós-eclosão (~20 %) no segundo grupo de exposição mais exposto de F1. Não se trata de critérios de validade *per se*, mas de recomendações destinadas a permitir o cálculo de NOEC sólidas.

10. Caso se observe um desvio em relação aos critérios de validade, devem analisar-se as consequências em relação à fiabilidade dos resultados do ensaio, devendo os desvios e a sua apreciação ser referidos no relatório de ensaio.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

Equipamento

11. Equipamento normal de laboratório, designadamente o seguinte:

a) Medidores de oxigénio e de pH;

b) Equipamento para determinação da dureza e da alcalinidade da água;

c) Aparelho adequado para o controlo da temperatura e, de preferência, um acompanhamento contínuo;

d) Cubas de um material quimicamente inerte e de capacidade adequada à carga e à densidade de ocupação recomendadas (ver apêndice 3);

e) Balança de precisão apropriada (isto é, com uma precisão de ± 0,5 mg).

▼M8

Água

12. Pode utilizar-se nos ensaios qualquer água na qual a espécie em estudo apresente taxas adequadas de crescimento e de sobrevivência a longo prazo. A qualidade da água deve manter-se constante durante o ensaio. Para assegurar que a água de diluição não influencia indevidamente o resultado do ensaio (por exemplo, por complexação do produto químico em estudo) nem afeta negativamente o desempenho dos progenitores, devem colher-se regularmente amostras para análise. Deve determinar-se o teor de metais pesados (Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni, etc.), dos principais aniões e catiões (Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, SO_4^{2-}, etc.), de pesticidas, de carbono orgânico total e de sólidos em suspensão, por exemplo, de seis em seis meses, caso se saiba que a qualidade da água de diluição se mantém relativamente constante. No apêndice 2 apresentam-se algumas características químicas de uma água de diluição aceitável. Os valores de pH devem situar-se entre 6,5 e 8,5, não devendo, num dado ensaio, sofrer variações superiores a ±0,5 unidades de pH.

Sistema de exposição

13. Não se especificam a conceção e os materiais utilizados no sistema de exposição. Para a construção desse sistema, devem utilizar-se vidro, aço inoxidável ou outro material quimicamente inerte que não tenha sido contaminado em ensaios anteriores. Para efeitos do presente ensaio, pode ser adequado um sistema de exposição constituído por um sistema de fluxo contínuo (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13).

Soluções de ensaio

14. A solução-mãe do produto químico em estudo deve ser introduzida no sistema de exposição por meio de uma bomba adequada. O débito da solução deve ser calibrado à luz da confirmação analítica das soluções de ensaio antes do início da exposição e deve ser objeto de controlo volumétrico periódico durante o ensaio. Em cada câmara, a solução é renovada em função das necessidades (por exemplo, mínimo de 5 renovações de volume/ /dia até 16 renovações de volume/dia ou até um débito de 20 ml/min), consoante a estabilidade do produto químico em estudo e a qualidade da água.

15. As soluções de ensaio são ajustadas à concentração pretendida por diluição da solução-mãe. De preferência, esta deve ser preparada por simples mistura ou agitação do produto químico em estudo na água de diluição por meios mecânicos (agitação e/ou dispersão ultrassónica, por exemplo). Podem ser utilizadas colunas/sistemas de saturação ou métodos de dosagem passiva (14) para obter uma solução-mãe com a concentração pretendida. Devem realizar-se todos os esforços para evitar a utilização de solventes ou outros veículos, porque: (1) alguns solventes podem, por si só, induzir toxicidade e/ou respostas indesejáveis ou inesperadas; (2) o ensaio de produtos químicos acima da sua solubilidade em água (frequente quando se utilizam solventes) pode resultar em determinações inexatas das concentrações efetivas; (3) a utilização de solventes pode resultar num grau significativo de formação de biofilmes decorrente da atividade microbiana, passível de ter impacto nas condições ambientais, bem como na capacidade de manter concentrações de exposição e (4) na ausência de dados históricos que demonstrem que o solvente não influencia o resultado do estudo, a utilização de solventes exige um tratamento com base no bem-estar animal, na medida em que são necessários mais indivíduos para a realização do ensaio. Para os produtos químicos difíceis de ensaiar, é possível, em último recurso, utilizar um solvente; consultar o documento de orientações n.º 23 da OCDE sobre ensaios de toxicidade aquática de substâncias e misturas difíceis (15), para determinar o melhor método. A escolha do solvente será determinada pelas

▼M8

propriedades químicas do produto químico em estudo e pela existência de dados históricos sobre a utilização do solvente. Se forem utilizados solventes como veículos, devem realizar-se controlos adequados para o solvente para além dos controlos (negativos) sem solvente (apenas água de diluição). Caso seja inevitável a utilização de um solvente e ocorra atividade microbiana (formação de biofilmes), recomenda-se o registo ou a inclusão no relatório da presença de biofilme em cada cuba (pelo menos uma vez por semana) durante todo o ensaio. Idealmente, a concentração de solvente deve ser mantida constante no controlo com solvente e em todos os grupos de tratamento. Se tal não suceder, deve-se utilizar no controlo com solvente a concentração mais elevada utilizada no tratamento de ensaio. Nos casos em que se utiliza um solvente como veículo, as concentrações máximas de solvente não devem exceder 100 µl/l ou 100 mg/l (15), recomendando-se que se mantenha a concentração de solvente mais baixa possível (por exemplo, < 20 µl/l), para evitar os potenciais efeitos do solvente nos parâmetros medidos (16).

Animais de ensaio

Seleção e confinamento dos peixes

16. A espécie utilizada no ensaio é o peixe-do-arroz-japonês, *Oryzias latipes*, devido ao seu curto ciclo de vida e à possibilidade de determinar o sexo genético. Embora outras espécies de pequenos peixes possam ser adaptadas a um protocolo de ensaio semelhante, os métodos e parâmetros de observação específicos descritos no presente método de ensaio são aplicáveis apenas ao peixe-do-arroz-japonês (ver ponto 1). Esta espécie adapta-se bem à reprodução em cativeiro; foram publicados métodos para a sua cultura (17) (18) (19) e estão disponíveis dados relativos à letalidade a curto prazo, às primeiras fases da vida e ao ciclo de vida completo (5) (6) (8) (9) (20). Todos os peixes são submetidos a um fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuridão. Os peixes são alimentados com artémias vivas (*Artemia* spp.), náuplios que podem ser complementados, se necessário, com alimentos floculados disponíveis no mercado. Estes alimentos devem ser analisados regularmente para garantir que não estão contaminados.

17. Desde que sejam seguidas as práticas de criação adequadas, não é necessário aplicar um protocolo de cultura específico. Por exemplo, o peixe-do-arroz-japonês pode ser criado em cubas de 2 litros com 240 larvas por cuba até às 4 spf, depois em cubas de 2 litros com 10 peixes por cuba até às 8 spf, altura em que os casais reprodutores são transferidos para cubas de 2 litros.

Aclimatação e seleção dos peixes

18. Os peixes de ensaio devem ser selecionados a partir de uma única unidade populacional de laboratório que tenha sido aclimatada durante, pelo menos, duas semanas antes do ensaio em condições de qualidade da água e de iluminação semelhantes às utilizadas no mesmo (este período de aclimatação não é um período de pré-exposição *in situ*). Recomenda-se que os peixes de ensaio sejam obtidos a partir de uma cultura interna, uma vez que o transporte de peixes adultos provoca *stress* e pode interferir com uma reprodução fiável. Os peixes devem ser alimentados duas vezes por dia, durante todo o período de confinamento e durante a fase de exposição, com náuplios de artémia, complementados, se necessário, com um alimento floculado disponível no mercado. Para iniciar o ensaio, considera-se necessário um mínimo de 42 casais reprodutores (54 se for necessário um controlo com solvente, devido, em parte, à falta de dados históricos para justificar o recurso apenas ao controlo sem solvente), de modo a garantir uma replicação adequada. Além disso, há que verificar, para cada casal reprodutor da geração F0, se se trata de um casal XX-XY (apresentando, para cada sexo, a configuração normal de cromossomas sexuais), para evitar a possível inclusão de machos espontâneos XX (ver ponto 39).

▼M8

19. Durante a fase de aclimatação, a mortalidade nos peixes de cultura deve ser registada e devem aplicar-se os critérios seguintes após um período de adaptação de 24 horas:

— Mortalidade superior a 10 % da população na cultura nos sete dias que antecedem a transferência para o sistema de ensaio: rejeitar o lote completo;

— Mortalidade entre 5 % e 10 % da população nos sete dias que antecedem a transferência para o sistema de ensaio: aclimatação durante um período complementar de sete dias após o período de aclimatação de duas semanas; se a mortalidade for superior a 5 % durante o segundo período de sete dias, rejeitar o lote completo;

— Mortalidade inferior a 5 % da população nos sete dias que antecedem a transferência para o sistema de ensaio: aceitar o lote.

20. Os peixes não devem receber tratamento em caso de doença durante o período de aclimatação de duas semanas que precede o ensaio e durante o período de exposição, devendo evitar-se completamente, se possível, qualquer tratamento. Os peixes com sinais clínicos de doença não devem ser utilizados no estudo. Deve manter-se um registo das observações e de eventuais tratamentos profiláticos e terapêuticos durante o período de cultura anterior ao ensaio.

21. A fase de exposição deve ser iniciada com adultos sexualmente dimórficos, geneticamente sexuados, provenientes de uma população laboratorial de animais sexualmente maduros criados a 25 °C ± 2 °C. Os peixes devem ser identificados como reprodutores comprovados (ou seja, que tenha produzido descendência viável) durante a semana que antecede a exposição. Para todo o grupo de peixes utilizados no ensaio, o intervalo de pesos individuais por sexo no início do ensaio deve ser mantido a ± 20 % da média aritmética do peso dos indivíduos do mesmo sexo. Antes do ensaio, deve proceder-se à pesagem de uma subamostra de peixes para estimar o peso médio. Os peixes selecionados devem ter pelo menos 12 spf e ter um peso ≥ 300 mg para as fêmeas e ≥ 250 mg para os machos.

CONCEÇÃO DO ENSAIO

Concentrações de ensaio

22. Recomenda-se a utilização de cinco concentrações do produto químico em estudo, para além do(s) controlo(s). Todas as fontes de informação devem ser tidas em conta aquando da seleção da gama de concentrações de ensaio: relações quantitativas estrutura-atividade (QSAR), dados estabelecidos pelo método de referências cruzadas, resultados de ensaios com peixes, nomeadamente de toxicidade aguda (capítulo C.1 do presente anexo), de reprodução a curto prazo (capítulo C.48 do presente anexo) e outros métodos de ensaio – por exemplo, capítulos C.15, C.37, C.41, C.47 ou C.49 do presente anexo (21) (22) (23) (24) (25) (26), se disponíveis, ou, se necessário, os resultados de um ensaio de determinação da gama das concentrações que inclua, se possível, uma fase de reprodução. Se for necessário um ensaio para determinar a gama de concentrações, pode ser efetuado em condições (qualidade da água, sistema de ensaio, carga animal) semelhantes às utilizadas para o ensaio definitivo. Caso seja necessário utilizar um solvente e não existam dados históricos disponíveis, pode utilizar-se o ensaio de determinação da gama de concentrações para identificar a adequação do solvente. A concentração máxima de ensaio não deve exceder a solubilidade em água, 10 mg/l ou 1/10 da CL50-96 horas (27). A concentração mais baixa deve

▼M8

ser 10 a 100 vezes inferior à concentração mais elevada. A utilização de cinco concentrações permite não só medir as relações dose-resposta, como também indica a concentração mínima com efeito observável (LOEC) e a NOEC, necessárias para a avaliação dos riscos em determinados programas regulamentares ou contextos jurídicos. Em geral, o fator de espaçamento entre as concentrações nominais do produto químico em estudo entre níveis de tratamento adjacentes é ≤ 3,2.

Replicados no âmbito dos grupos de tratamento e dos controlos

23. Devem utilizar-se, no mínimo, seis câmaras de ensaio replicadas por cada concentração de ensaio (ver o apêndice 7). Durante a fase de reprodução (exceto para a geração F0), a estrutura de replicação é duplicada para a avaliação da fecundidade, utilizando-se em cada replicado apenas um casal reprodutor (ver ponto 42).

24. Para além da série de concentrações do produto químico em estudo, deve utilizar-se um controlo com água de diluição e, se necessário, um controlo com solvente. Para assegurar um nível adequado de representatividade estatística, deve duplicar-se o número de câmaras de replicação para os controlos (ou seja, devem utilizar-se pelo menos doze replicados para os controlos). Durante a fase de reprodução, o número de replicados nos controlos é duplicado (ou seja, 24 replicados no mínimo, cada um com apenas um casal reprodutor). Após a reprodução, os replicados dos controlos não devem conter mais de 20 embriões (peixes).

PROCEDIMENTO

Início do ensaio

25. Os peixes sexualmente ativos utilizados para iniciar a geração F0 do ensaio são selecionados com base em dois critérios: a idade (normalmente mais de 12 spf, mas de preferência não mais de 16 spf) e o peso (≥ 300 mg para as fêmeas e ≥ 250 mg para os machos).

26. Os pares macho-fêmea que satisfazem as especificações acima indicadas são transferidos como casais individualizados para as cubas destinadas a receber os replicados, ou seja, doze replicados nos controlos e seis replicados nos grupos tratados com o produto químico no início do ensaio. As cubas são atribuídas aleatoriamente a um tratamento (por exemplo, T1-T5 e controlo) e a um replicado (por exemplo, A-L nos controlos e A-F em tratamento), sendo depois colocadas no sistema de exposição com o débito adequado para cada cuba.

Condições de exposição

27. O apêndice 3 apresenta um resumo completo dos parâmetros e condições do ensaio. O respeito destas especificações deve traduzir-se nos controlos por valores medidos semelhantes aos enumerados no apêndice 4.

28. Durante o ensaio, o oxigénio dissolvido, o pH e a temperatura devem ser medidos em, pelo menos, um recipiente de ensaio para cada grupo de tratamento e para o grupo de controlo. Estas medições, com exceção da temperatura, devem ser efetuadas, no mínimo, uma vez por semana durante o período de exposição. A temperatura da água ao longo de todo o estudo deve situar-se, em média, entre 24 °C e 26 °C e deve ser medida todos os dias durante o período de exposição. Os valores de pH devem situar-se entre 6,5 e 8,5, não devendo, num dado ensaio, sofrer variações superiores a ±0,5 unidades de pH. Os replicados no âmbito de um tratamento, bem como os grupos de tratamento no âmbito do ensaio, não devem diferir estatisticamente uns dos outros (com base nas temperaturas medidas diariamente e excluindo eventuais afastamentos de curta duração).

▼M8

Duração da exposição

29. O teste expõe os peixes sexualmente aptos à reprodução a partir da geração F0 durante três semanas. Na semana 4 (aproximadamente no dia 24 do ensaio), é estabelecida a geração F1 e os casais reprodutores F0 são eutanasiados, sendo registado o seu peso e comprimento (ver ponto 34). A geração F1 é depois exposta durante mais de 14 semanas (15 semanas no total para F1) e a geração F2 é exposta durante duas semanas até à eclosão. A duração total do ensaio é, em princípio, de 19 semanas (ou seja, até à eclosão da geração F2). A cronologia das operações é apresentada no quadro 2 e explicada em pormenor no apêndice 9.

Regime alimentar

30. Os peixes podem ser alimentados *ad libitum* com *Artemia* spp. (náuplios com 24 horas de vida), complementadas, se necessário, com alimentos floculados disponíveis no mercado. Estes devem ser regularmente analisados para garantir que não estão contaminados com pesticidas organoclorados, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP) ou bifenilos policlorados (PCB). Devem evitar-se alimentos com um nível elevado de substâncias ativas no sistema endócrino (como fitoestrogénios), que podem comprometer a resposta ao ensaio. Os alimentos não consumidos e as matérias fecais devem ser removidos dos recipientes de ensaio por recurso a um método adequado, por exemplo limpando cuidadosamente o fundo de cada cuba com um sifão. Os lados e o fundo de cada cuba devem também ser limpos uma ou duas vezes por semana (por exemplo, raspando com uma espátula). O apêndice 5 apresenta um exemplo de um regime alimentar. As doses distribuídas baseiam-se no número de peixes por replicado. Por conseguinte, são reduzidas em caso de mortalidade num replicado.

Determinação analítica e medições

31. Antes do início do período de exposição, é necessário verificar o bom funcionamento do sistema de distribuição do produto químico. Devem definir-se todos os métodos analíticos necessários, incluindo o conhecimento suficiente da estabilidade do produto químico no sistema de ensaio. Durante este último, determinam-se as concentrações do produto químico em estudo a intervalos adequados, de preferência pelo menos uma vez por semana num replicado para cada grupo de tratamento, mudando todas as semanas de replicado num mesmo grupo de tratamento.

32. Durante o ensaio, os débitos de diluente e de solução-mãe devem ser verificados a intervalos regulares (no mínimo, três vezes por semana). Recomenda-se que os resultados se baseiem em concentrações medidas. No entanto, se a concentração do produto químico em estudo em solução tiver sido mantida satisfatoriamente no intervalo de ± 20 % em relação aos valores médios medidos ao longo de todo o ensaio, os resultados podem basear-se nos valores nominais ou nos valores medidos. No caso de produtos químicos que apresentem uma acumulação marcada nos peixes, as concentrações de ensaio podem diminuir à medida que os peixes crescem. Nesses casos, recomenda-se que a taxa de renovação da solução de ensaio em cada câmara seja adaptada de modo a manter as concentrações de ensaio tão constantes quanto possível.

Observações e parâmetros medidos

33. Os parâmetros medidos são a fecundidade, a fertilidade, a eclosão, o crescimento e a sobrevivência, com o objetivo de avaliar os possíveis efeitos a nível da população. Também devem ser feitas observações diárias do comportamento, havendo que registar quaisquer comportamentos anómalos. Os níveis hepáticos de ARNm *vtg* ou de proteína VTG medidos por imunoensaio (28), os marcadores sexuais fenotípicos – como as papilas da barbatana

▼M8

anal características do macho –, a avaliação histológica do sexo gonadal e a avaliação histopatológica dos rins, do fígado e das gónadas (ver lista de parâmetros no quadro 1) constituem outros parâmetros mecanísticos. Todos estes parâmetros específicos são avaliados no contexto da determinação do sexo genético do indivíduo baseada na presença ou na ausência do gene *dmy*, que determina o sexo masculino no peixe-do-arroz-japonês (ver ponto 41). Além disso, é também avaliado o tempo necessário para a desova. Podem igualmente obter-se rácios sexuais fenotípicos simples utilizando as informações provenientes das contagens de papilas da barbatana anal para definir os indivíduos como macho ou fêmea do ponto de vista fenotípico. Não se espera que o método de ensaio detete desvios ligeiros em relação ao rácio sexual previsto, uma vez que o número relativamente reduzido de peixes por replicado não proporciona uma representatividade estatística suficiente. Além disso, durante a avaliação histopatológica, as gónadas são avaliadas e são realizadas análises muito mais potentes para determinar o fenótipo gonadal no contexto do sexo genético.

34. O principal objetivo do presente método de ensaio consiste em avaliar os potenciais efeitos de um produto químico em estudo numa determinada população. Os parâmetros mecanísticos (VTG, CSS e determinados efeitos histopatológicos nas gónadas) podem também ajudar a determinar se existe um efeito mediado pela atividade endócrina. No entanto, estes parâmetros de ordem mecanística também podem ser influenciados pela toxicidade sistémica ou outras toxicidades. Deste modo, é possível avaliar em pormenor a histopatologia hepática e renal, a fim de melhor compreender as eventuais respostas a nível dos parâmetros mecanísticos. No entanto, mesmo que não se proceda a estas avaliações pormenorizadas, as anomalias visíveis observadas acidentalmente durante a avaliação histopatológica têm, na mesma, de ser registadas e notificadas.

Eutanásia dos peixes

35. No final da exposição das gerações F0 e F1 e aquando da recolha de uma subamostra de peixes subadultos, os peixes devem ser eutanasiados com quantidades adequadas de uma solução anestésica (por exemplo, metanossulfonato de tricaína, MS-222 (n.º CAS 886-86-2), 100-500 mg/l) tamponada com 300 mg/l de $NaHCO_3$ (bicarbonato de sódio, n.º CAS 144-55-8), para reduzir a irritação da membrana mucosa. Se os peixes apresentarem sinais de sofrimento considerável (muito graves, com morte previsível) e se considerar estarem moribundos, devem ser anestesiados e eutanasiados e tratados como mortalidade para efeitos de análise de dados. Quando um peixe for eutanasiado devido a morbilidade, o facto deve ser registado e notificado. Consoante o momento do estudo em que o peixe é eutanasiado, pode ser removido para uma análise histopatológica (fixando o peixe para possível histopatologia).

Manuseamento dos ovos e das larvas

Colheita de ovos dos casais reprodutores para a reprodução da geração seguinte

36. A colheita dos ovos é efetuada no primeiro dia (ou nos primeiros dois dias, se necessário) da semana de ensaio 4, entre a F0 e a F1, e da semana de ensaio 18, entre a F1 e a F2. A semana de ensaio 18 corresponde a peixes adultos da geração F1, de 15 spf. É importante que todos os ovos sejam retirados de cada cuba no dia anterior ao início da colheita dos ovos, para garantir que todos os ovos recolhidos de um casal reprodutor são provenientes de uma única desova. Após a desova, o peixe-do-arroz-japonês fêmea transporta, por vezes, os seus ovos junto da cloaca até que os possa depositar num substrato. Na ausência de um substrato na cuba, os ovos podem ser encontrados junto à fêmea ou no fundo da cuba. Consoante a sua localização, os ovos são retirados cuidadosamente da fêmea ou sifonados do fundo da cuba na semana de ensaio 4 de F0 e na semana de ensaio 18 da F1. Todos os ovos recolhidos no âmbito de um tratamento são reunidos antes de serem distribuídos pelas câmaras de incubação.

▼M8

37. Os filamentos que mantêm os ovos postos juntos devem ser removidos. Os ovos fecundados (até 20) são recolhidos de cada casal reprodutor (um casal por replicado), agrupados por tratamento e distribuídos de forma sistemática por câmaras de incubação adequadas (apêndices 6 e 7). Utilizando um bom microscópio de dissecação, é possível observar as marcas do início da fecundação/desenvolvimento, tais como a elevação da membrana de fertilização (cório), a divisão celular em curso ou a formação da blástula. As câmaras de incubação podem ser colocadas em «aquários de incubação» separados para cada tratamento (nos quais, neste caso, devem ser medidos os parâmetros de qualidade da água e as concentrações do produto químico em estudo) ou no aquário de replicados que conterá as larvas eclodidas (por exemplo, eleuteroembriões). Se for necessário um segundo dia de colheita (23.º dia de ensaio), todos os ovos de ambos os dias devem ser reunidos e redistribuídos de forma sistemática por cada um dos replicados de tratamento.

Criação de ovos até à eclosão

38. Os ovos fecundados são continuamente agitados, por exemplo, por bolhas de ar dentro da incubadora ou por oscilação vertical da mesma. A mortalidade dos ovos fecundados (embriões) é verificada e registada diariamente. Os ovos mortos são retirados das incubadoras (apêndice 9). No 7.º dia pós-fecundação (dpf), a agitação é interrompida ou reduzida de tal modo que os ovos fecundados se depositem na base da incubadora. Promove-se assim a eclosão, normalmente no dia seguinte ou no segundo dia. Para cada tratamento e controlo, contam-se os alevins (larvas juvenis; eleuteroembriões), agrupando os replicados. Os ovos fecundados que não tenham eclodido ao fim de duas vezes o período médio de eclosão no controlo (normalmente 16 ou 18 dpf) são considerados não viáveis e rejeitados.

39. Transferem-se doze alevins para cada cuba replicada. Os alevins provenientes das câmaras de incubação são reunidos e distribuídos sistematicamente pelas cubas replicadas (apêndice 7). Para tal, pode selecionar-se de forma aleatória um alevim do lote de tratamento e acrescentar sequencialmente um alevim retirado aleatoriamente para um aquário de replicação. Cada cuba deve conter um número igual (n=12) das larvas eclodidas (no máximo 20 larvas cada). Se não houver um número suficiente de alevins para preencher todos os replicados expostos ao tratamento, recomenda-se assegurar que o maior número possível de replicados contém 12 alevins. Estes podem ser manipulados com segurança utilizando pipetas de vidro de grande diâmetro. Os alevins suplementares são eutanasiados com um anestésico. Nas semanas anteriores à constituição dos casais reprodutores, é necessário registar o dia em que se observa o primeiro evento de desova em cada replicado.

Constituição dos casais reprodutores

Corte das barbatanas e determinação do sexo genotípico

40. A determinação do sexo genotípico através do corte das barbatanas é efetuada às 9-10 spf (ou seja, semanas de ensaio 12-13 para a geração F1). Todos os peixes de uma cuba são anestesiados por recurso a métodos aprovados – por exemplo, IACUC – e é retirada uma pequena amostra de tecido da extremidade dorsal ou ventral da barbatana caudal de cada peixe, para determinar o sexo genotípico do indivíduo (29). Os peixes de um replicado podem ser alojados em pequenas gaiolas, se possível um por gaiola, na cuba replicada. Em alternativa, podem ser mantidos dois peixes em cada gaiola, se forem distinguíveis uns dos outros. Um método consiste em efetuar cortes diferenciais na barbatana caudal (por exemplo, um na extremidade dorsal e outro na ventral) aquando da recolha da amostra de tecido.

▼M8

41. O sexo genotípico do peixe-do-arroz-japonês é determinado por um gene identificado e sequenciado (*dmy*), situado no cromossoma Y. A presença do *dmy* indica um indivíduo XY, seja qual for o fenótipo, enquanto a ausência de *dmy* indica um indivíduo XX, independentemente do fenótipo (30); (31). Extrai-se ácido desoxirribonucleico (ADN) de cada corte de barbatana; a presença ou ausência de *dmy* pode ser determinada por métodos de reação em cadeia da polimerase (PCR) [ver apêndice 9 no capítulo C.41 do presente anexo ou os apêndices 3 e 4 em (29)].

Definição de casais reprodutores

42. Para definir casais reprodutores XX-XY, utiliza-se a informação sobre o sexo genotípico, independentemente do fenótipo externo, que pode ser alterado por exposição a um produto químico em estudo. No dia seguinte à determinação do sexo genotípico de cada peixe, são selecionados aleatoriamente dois peixes XX e dois peixes XY de cada replicado e definidos dois casais reprodutores XX-XY. Se um replicado não contiver dois peixes XX ou dois XY, convém encontrar peixes adequados noutros replicados no âmbito do tratamento. A prioridade consiste em obter o número recomendado de replicados de casais reprodutores (12) para cada tratamento e nos controlos (24). Os peixes com anomalias evidentes (problemas de bexiga natatória, malformações espinais, variações de tamanho extremas, etc.) devem ser excluídos aquando da constituição de casais reprodutores. Durante a fase de reprodução para a geração F1, cada cuba replicada deve conter apenas um casal reprodutor.

Amostragem de subadultos e avaliação dos parâmetros

Amostragem de casais não reprodutores

43. Após a constituição dos casais reprodutores, os peixes não selecionados para reprodução são eutanasiados para a medição dos parâmetros de subadultos na semana de ensaio 12-13 (F1). É extremamente importante que os peixes sejam manuseados de forma a que o sexo genotípico determinado para a seleção dos casais reprodutores continue a poder ser associado a um determinado indivíduo. Todos os dados recolhidos são analisados em função do sexo genotípico do peixe específico. Cada peixe é utilizado para determinar diversos parâmetros, nomeadamente as taxas de sobrevivência dos peixes juvenis/subadultos [semanas de ensaio 7-12/13 (F1)], o aumento do comprimento (pode ser medido o comprimento padrão se a barbatana caudal tiver sido reduzida devido à amostragem para análise do sexo genético; mede-se o comprimento total se apenas tiver sido recortada uma parte da barbatana caudal, dorsal ou ventral, para *dmy*) e a massa corporal (ou seja, peso húmido, peso enxuto), o ARNm *vtg* (ou VTG) hepático e as papilas da barbatana anal (ver quadros 1 e 2). Note-se que, para calcular o crescimento médio num grupo de tratamento, são também necessários o peso e o comprimento dos casais reprodutores.

Recolha de amostras de tecido e medição da vitelogenina

44. O fígado é dissecado e deve ser armazenado a ≤ –70 °C até à medição do ARNm *vtg* (ou da VTG). A cauda do peixe, incluindo a barbatana anal, é conservada num fixador adequado (por exemplo, de Davidson) ou fotografada de modo a que seja possível contar, posteriormente, as papilas da barbatana anal. É também possível recolher amostras de outros tecidos (por exemplo, gónadas), se assim se pretender, e conservá-los. A concentração de VTG hepática deve ser quantificada por uma técnica ELISA homóloga (ver os procedimentos recomendados para o peixe-do-arroz-japonês no apêndice 6, capítulo C.48, do presente anexo). Como alternativa, a Agência de Proteção do Ambiente dos EUA estabeleceu os métodos para a quantificação do ARNm *vtg*, ou seja, a extração do ARNm do gene *vtg I* de uma amostra hepática e a quantificação do número de cópias do gene *vtg I* (por

▼M8

ng do ARNm total) por PCR quantitativa (29). Para determinar o número de cópias do gene *vtg* nos grupos de controlo e de tratamento, um método mais económico em termos de recursos e menos difícil do ponto de vista técnico consiste em determinar a variação relativa (fator multiplicativo) na expressão do gene *vtg I* entre os grupos de controlo e de tratamento.

Características sexuais secundárias

45. Em circunstâncias normais, só os peixes-do-arroz-japoneses machos sexualmente maduros têm papilas, que se desenvolvem nas placas de junção de determinados raios da barbatana anal e constituem uma característica sexual secundária, podendo servir de biomarcador para efeitos desreguladores do sistema endócrino. O apêndice 8 apresenta o método de contagem das papilas da barbatana anal (número de placas de junção com papilas). O número de papilas da barbatana anal por indivíduo também é utilizado para classificar os indivíduos como fenótipo externo macho ou fêmea e para estabelecer, assim, um rácio sexual simples para cada replicado. Um peixe-do-arroz-japonês com um número superior a zero é definido como macho; um peixe-do-arroz-japonês com zero papilas da barbatana anal é definido como fêmea.

Avaliação da fecundidade e da fertilidade

46. A fecundidade e a fertilidade são avaliadas nas semanas de ensaio 1 a 3 na geração F0 e nas semanas de ensaio 15 a 17 na geração F1. Os ovos são recolhidos diariamente de cada casal reprodutor durante 21 dias consecutivos, sendo retirados com cuidado de sob o ventre das fêmeas (colocadas numa rede) e/ou sifonados do fundo do aquário todas as manhãs. Tanto a fecundidade como a fertilidade são registadas diariamente para cada casal reprodutor de replicação. A fecundidade é definida como o número de ovos postos e a fertilidade é definida funcionalmente como o número de ovos fecundados e viáveis no momento da contagem. Esta deve ser efetuada o mais rapidamente possível após a colheita dos ovos.

47. A fecundidade dos replicados é registada diariamente como o número de ovos por casal reprodutor, que é analisado pelos procedimentos estatísticos recomendados utilizando os meios de replicação. A fertilidade dos replicados é a soma do número de ovos férteis produzidos por um casal reprodutor dividido pela soma do número de ovos produzidos por esse casal. Estatisticamente, a fertilidade é analisada como um rácio por replicado. A taxa de eclosão dos replicados corresponde ao número de alevins dividido pelo número de embriões carregados (normalmente 20). Estatisticamente, a taxa de eclosão é analisada como rácio por replicado.

Amostragem de adultos e avaliação dos parâmetros

Amostragem de casais reprodutores

48. Após a semana de ensaio 17 (ou seja, após se iniciar com êxito da geração F2), os adultos F1 são eutanasiados e são avaliados vários parâmetros (ver quadros 1 e 2). A barbatana anal é examinada para avaliar as papilas (ver apêndice 8) e/ou a cauda é retirada ao nível imediatamente posterior à cloaca e fixada para contagem posterior das papilas. Uma parte da barbatana caudal pode ser recolhida e neste momento e conservada para efeitos de verificação do sexo genético (*dmy*), se desejado. Se necessário, pode ser colhida uma amostra de tecido para repetir a análise *dmy*, a fim de verificar o sexo genético de um peixe específico. A cavidade corporal é aberta para permitir uma perfusão com um fixador adequado (por exemplo, de Davidson), antes da imersão do corpo inteiro no fixador. No entanto, se for efetuada uma etapa de permeabilização adequada antes da fixação, não é necessário abrir a cavidade corporal.

▼**M8**

Histopatologia

49. Cada peixe é objeto de uma avaliação histológica que visa detetar patologias no tecido gonadal (30) (29). Como se indica no ponto 33, outros parâmetros mecanísticos avaliados neste ensaio (por exemplo, VTG, CSS e determinados efeitos histopatológicos gonadais) podem ser influenciados por toxicidade sistémica ou outros tipos de toxicidade. Deste modo, é possível avaliar em pormenor a histopatologia hepática e renal, a fim de melhor compreender as eventuais respostas a nível dos parâmetros mecanísticos. No entanto, mesmo que não se efetuem estas avaliações pormenorizadas, as anomalias visíveis observadas acidentalmente durante a avaliação histopatológica têm, na mesma, de ser registadas e notificadas. Pode ponderar-se uma «leitura descendente», começando pelo grupo de tratamento mais elevado (em comparação com o controlo) e terminando num tratamento sem efeito; contudo, recomenda-se a consulta das orientações relativas à histopatologia (29). Regra geral, todas as amostras são processadas/preparadas antes de serem examinadas pelo patologista. Caso se opte por uma «leitura descendente», importa salientar que o procedimento de Rao-Scott Cochrane-Armitage by Slices (RSCABS) se baseia na expectativa de um aumento do impacto biológico (da patologia) à medida que as doses aumentam. Por conseguinte, deixa de se poder considerar apenas uma dose única elevada sem quaisquer doses intermédias. Esta abordagem é aceitável se não for necessário proceder a uma análise estatística para determinar que a dose elevada não tem qualquer efeito. O fenótipo gonadal decorre também desta avaliação.

Outras observações

50. O ensaio MEOGRT fornece dados que podem ser utilizados (por exemplo, numa abordagem baseada na análise do ónus da prova) para avaliar simultaneamente pelo menos dois tipos gerais de vias determinantes dos efeitos nocivos (AOP) que resultam numa perturbação da função reprodutora: a) vias de mediação endócrina com perturbação do eixo endócrino hipotálamo-hipófise-gonadal (HHG); e b) vias que provocam reduções da sobrevivência, do crescimento (comprimento e peso) e da reprodução através de toxicidade de mediação não endócrina. Os parâmetros geralmente medidos em ensaios de toxicidade crónica, como o ensaio ao longo do ciclo de vida completo e o ensaio nas primeiras fases da vida, são também determinados no presente ensaio e podem ser utilizados para avaliar os perigos inerentes aos modos de ação tóxica de mediação não endócrina e às vias de toxicidade de mediação endócrina. Durante o ensaio, devem fazer-se observações diárias do comportamento, havendo que registar quaisquer comportamentos anómalos. Além disso, deve registar-se a mortalidade e calcular-se a sobrevivência até à seleção dos peixes (semana de ensaio 6/7), a sobrevivência desde a seleção até à amostragem de subadultos (9-10 spf) e a sobrevivência desde a constituição dos casais até à amostragem de peixes adultos.

Quadro 1

Síntese dos parâmetros do ensaio MEOGRT (*)

Fase da vida	Parâmetro	Geração
Embrião (2 spf)	Eclosão (% e tempo até à eclosão)	F1, F2
Juvenil (4 spf)	Sobrevivência	F1
Subadulto (9 ou 10 spf)	Sobrevivência	F1
	Crescimento (comprimento e peso)	

▼M8

Fase da vida	Parâmetro	Geração
	Vitelogenina (ARNm ou proteína)	
	Características sexuais secundárias (papilas da barbatana anal)	
	Rácio sexual externo	
	Tempo até à 1.ª desova	
Adulto (12-14 spf)	Reprodução (fecundidade e fertilidade)	F0, F1
Adulto (15 spf)	Sobrevivência	F1
	Crescimento (comprimento e peso)	
	Características sexuais secundárias (papilas da barbatana anal)	
	Histopatologia (gónadas, fígado, rins)	

(*) Estes parâmetros devem ser objeto de análise estatística

CRONOLOGIA

51. O quadro 2 ilustra a cronologia do ensaio MEOGRT, o qual MEOGRT inclui 4 semanas de exposição de adultos F0 e 15 semanas de exposição da geração F1, assim como um período de exposição da segunda geração (F2), até à eclosão (2 spf). O apêndice 9 recapitula as diferentes etapas do ensaio, do início ao fim do ensaio MEOGRT.

Quadro 2

Cronologia da exposição e dos parâmetros avaliados durante o ensaio MEOGRT

MEOGRT: cronologia da exposição e dos parâmetros

F0	1	2	3	4															
F1				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
F2																		1	2
Semana de	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Fase de vida					**Embrião**					**Larva**					**Juvenil**			**Subadulto**	**Adulto**
Parâmetros																			
Fecundidade	F_0														F_1				
Fertilidade	F_0														F_1				
Eclosão					F_1														F_2
Sobrevivência						F_1						F_1						F_1	
Crescimento				F_0								F_1						F_1	
Vitelogenina												F_1							
Car. sex. secundárias												F_1						F_1	
Histopatologia																		F_1	
Semana de ensaio	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19

- A conceção experimental tem 7 grupos de replicados
  - 5 para tratamentos com o produto químico em estudo
  - 2 para os tratamentos de controlo (4 se se utilizar solvente)
- Conceção intragrupo
  - 12 replicados para reprodução, patologia adulta e CSS (sem. 10 a 18)
  - 6 replicados para eclosão, sobrevivência e vtg; e CSS e crescimento de subadultos (sem. 1 a 9)

CSS: caracteres sexuais secundários; sem: semanas;

vtg: vitelogenina

▼M8

DADOS E RELATÓRIO

Análise estatística

52. Uma vez que o sexo genotípico é determinado para todos os peixes do ensaio, importa analisar os dados separadamente para cada sexo genotípico (por exemplo, machos XY e fêmeas XX). O incumprimento desta exigência reduzirá, em grande medida, a representatividade estatística de qualquer análise. É preferível efetuar as análises estatísticas seguindo os procedimentos descritos no documento da OCDE sobre os métodos atuais de análise estatística dos dados de ecotoxicidade (*Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application*) (32). O apêndice 10 fornece mais orientações nesta matéria.

53. A conceção do ensaio e a seleção dos testes estatísticos devem assegurar a possibilidade de para detetar alterações de importância biológica nos parâmetros, sempre que seja necessário comunicar uma NOEC (32). O registo das concentrações efetivas e dos parâmetros pertinentes pode ser condicionado pelo quadro regulamentar aplicável. Convém identificar, para cada parâmetro, a percentagem de variação que importa detetar ou estimar. A conceção experimental deve ser adaptada tendo isso em conta. É improvável que ocorra a mesma variação percentual em todos os parâmetros e que seja possível conceber uma experiência realizável passível de satisfazer os referidos critérios para todos os parâmetros. Por conseguinte, a experiência deve ser concebida de modo a concentrar-se adequadamente nos parâmetros que sejam importantes no seu contexto. O apêndice 10 contém um fluxograma estatístico e orientações para facilitar o tratamento dos dados e a escolha do teste estatístico ou do modelo mais adequado a utilizar. Podem utilizar-se outras abordagens estatísticas, desde que sejam cientificamente justificadas.

54. É necessário analisar as variações em cada série de replicados, efetuando uma análise de variância ou recorrendo a tabelas de contingência, e utilizar métodos de análise estatística suficientes com base nessa análise. A fim de efetuar uma comparação múltipla entre os resultados obtidos para cada concentração e os resultados obtidos com os controlos, recomenda-se um procedimento descendente (por exemplo, o teste de Jonckheere-Terpstra) para respostas contínuas. Se os dados não forem compatíveis com uma relação concentração-resposta monótona, utiliza-se o teste de Dunnett ou o teste de Dunn (após uma adequada transformação dos dados, se necessário).

55. No que respeita à fecundidade, as contagens de ovos são diárias, mas podem ser analisadas na sua globalidade ou como uma medida repetida. O apêndice 10 descreve pormenorizadamente como analisar este parâmetro. No caso dos dados histopatológicos expressos na forma de índices de gravidade, foi desenvolvido um novo teste estatístico, o Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices (RSCABS) (33).

56. Devem comunicar-se todos os parâmetros observados nos tratamentos químicos que difiram significativamente dos controlos adequados.

Considerações relativas à análise dos dados

Utilização de níveis de tratamento comprometidos

57. Há que ter em conta vários fatores para determinar se um replicado ou um tratamento completo apresenta sinais de toxicidade manifesta e deve ser excluído da análise. A toxicidade manifesta caracteriza-se por uma mortalidade > 4 indivíduos num replicado entre 3 spf e 9 spf que não possa ser explicada por um erro técnico. As hemorragias, os comportamentos anormais, a natação anormal, a anorexia e quaisquer outros sinais clínicos de doença constituem outros sinais de toxicidade manifesta. No caso de sinais

▼M8

subletais de toxicidade, pode ser necessário proceder a avaliações qualitativas, que devem ser sempre efetuadas tendo por referência o grupo de controlo para a água de diluição (apenas água limpa). Caso surja uma toxicidade manifesta no(s) grupo(s) de tratamento mais exposto(s), recomenda-se que esses tratamentos sejam excluídos da análise.

Controlos com solvente

58. A utilização de um solvente só se deve ponderar em último recurso, após terem sido analisadas todas as outras opções de administração do produto químico. Caso se utilize um solvente, é necessário incluir no ensaio um controlo para a água de diluição. No final do ensaio, deve efetuar-se uma avaliação dos efeitos potenciais do solvente. Para tal, efetua-se uma comparação estatística dos resultados do grupo de controlo com solvente com os do grupo de controlo com água de diluição. Os parâmetros mais importantes a ter em conta nesta análise são os fatores determinantes do crescimento (peso), já que podem ser afetados em caso de toxicidade generalizada. Se se detetarem diferenças estatisticamente significativas nestes parâmetros entre o grupo de controlo com água de diluição e o grupo de controlo com solvente, deve recorrer-se ao parecer de um perito para determinar se a validade do ensaio está comprometida. Se os dois controlos diferirem, os grupos expostos ao produto químico devem ser comparados com o controlo com solvente, a menos que se saiba que é preferível compará-los com o controlo com água de diluição. Caso não haja diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos de controlo, recomenda-se que os grupos expostos ao produto químico em estudo sejam comparados com os dois grupos de controlo em conjunto (controlo com solvente e controlo com água de diluição), exceto se se souber que é preferível compará-los, quer com o grupo de controlo com água de diluição, quer com o grupo de controlo com solvente.

Relatório de ensaio

59. O relatório de ensaio deve incluir os seguintes elementos:

Produto químico em estudo: natureza física e propriedades físico-químicas pertinentes

— Dados de identificação química.

Substância monocomponente:

— aspeto físico, solubilidade na água e outras propriedades físico-químicas pertinentes;

— identificação química, como o nome IUPAC ou CAS, o número CAS, o código SMILES ou InChI, a fórmula estrutural, a pureza, a identidade química das impurezas, se necessário e exequível, etc. (incluindo o teor de carbono orgânico, se for caso disso).

Substância multicomponentes, UVCB e misturas:

— caracterizada, na medida do possível, pela identidade química (ver acima), pela ocorrência quantitativa e pelas propriedades físico-químicas relevantes dos componentes.

Espécie utilizada no ensaio

— Nome científico, estirpe (se conhecida), origem e método de recolha dos ovos fecundados e posterior manuseamento.

Condições de ensaio

— Fotoperíodo(s);

— Conceção do ensaio (por exemplo, tamanho da cuba, volume de água e material, número de câmaras de ensaio e replicados, número de alevins por replicado);

▼**M8**

— Método de preparação das soluções-mãe e frequência da renovação (sempre que se utilizem agentes solubilizantes, a sua concentração deve ser indicada);

— Método de dosagem do produto químico em estudo (por exemplo, bombas, sistemas de diluição);

— Eficiência de recuperação do método e valores nominais das concentrações de ensaio, limite de quantificação, médias dos valores medidos nas cubas de ensaio e respetivos desvios-padrão; método de obtenção desses desvios e médias, bem como elementos comprovativos de que as medições correspondem às concentrações do produto químico em estudo perfeitamente dissolvido;

— Características da água de diluição: pH, dureza, temperatura, concentração do oxigénio dissolvido, níveis de cloro residual (caso tenham sido medidos), carbono orgânico total (idem), sólidos em suspensão (idem), salinidade do meio de ensaio (idem) e quaisquer outras medições efetuadas;

— Os valores nominais das concentrações de ensaio, as médias dos valores medidos e os respetivos desvios-padrão;

— Qualidade da água nos recipientes de ensaio, pH, temperatura (diariamente) e concentração de oxigénio dissolvido;

— Informações pormenorizadas sobre a alimentação (por exemplo, tipo de alimentos, origem, quantidade distribuída e frequência).

Resultados:

— Provas de que os controlos cumpriram os critérios de validação globais;

— Dados relativos ao grupo de controlo (mais o controlo com o solvente, se utilizado) e aos grupos de tratamento: eclosão (taxa de eclosão e tempo até à eclosão) para F1 e F2, sobrevivência após a eclosão para F1, crescimento (comprimento e peso corporal) para F1, sexo genotípico e diferenciação sexual (por exemplo, características sexuais secundárias baseadas nas papilas da barbatana anal e na histologia gonadal) para F1, sexo fenotípico para F1, características sexuais secundárias (papilas da barbatana anal) para F1, ARNm *vtg* (ou proteína VTG) para F1, avaliação histopatológica (gónadas, fígado e rins) para F1 e reprodução (fecundidade e fertilidade) para F0, F1 (ver quadros 1 e 2);

— Abordagem de análise estatística (análise de regressão ou da variância) e tratamento dos dados (testes e modelos estatísticos utilizados);

— Concentração sem efeitos observáveis (NOEC) para cada resposta avaliada;

— Concentração mínima com efeito observável (LOEC) para cada resposta avaliada (a p=0,05); CE_x para cada resposta avaliada, se aplicável, e intervalos de confiança (90 % ou 95 %, por exemplo), gráfico do modelo ajustado utilizado para a calcular a CEx, declive da curva concentração-resposta, fórmula do modelo de regressão e estimativa dos parâmetros do modelo e dos respetivos erros-padrão.

— Qualquer desvio em relação ao presente método de ensaio e aos critérios de aceitação, bem como considerações relativas às eventuais consequências do resultado do ensaio.

▼M8

60. No que diz respeito aos resultados das medições dos parâmetros, devem apresentar-se os valores médios e os respetivos desvios-padrão (por replicado e por concentração, se possível).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(1) OECD (2012a). Fish Toxicity Testing Framework, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 171), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(2) Padilla S, Cowden J, Hinton DE, Yuen B, Law S, Kullman SW, Johnson R, Hardman RC, Flynn K and Au DWT. (2009). Use of Medaka in Toxicity Testing. Current Protocols in Toxicology 39: 1-36.

(3) OECD (2012b). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disrupters. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 150), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(4) Benoit DA, Mattson VR, Olson DL. (1982). A Continuous-Flow Mini-Diluter System for Toxicity Testing. Water Research 16: 457–464.

(5) Yokota H, Tsuruda Y, Maeda M, Oshima Y, Tadokoro H, Nakazono A, Honjo T and Kobayashi K. (2000). Effect of Bisphenol A on the Early Life Stage in Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 19: 1925-1930.

(6) Yokota H, Seki M, Maeda M, Oshima Y, Tadokoro H, Honjo T and Kobayashi K. (2001). Life-Cycle Toxicity of 4-Nonylphenol to Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 20: 2552--2560.

(7) Kang IJ, Yokota H, Oshima Y, Tsuruda Y, Yamaguchi T, Maeda M, Imada N, Tadokoro H and Honjo T. (2002). Effects of 17β-Estradiol on the Reproduction of Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). Chemosphere 47: 71–80.

(8) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Tsuruda Y, Maeda M, Tadokoro H and Kobayashi K. (2002). Effect of Ethinylestradiol on the Reproduction and Induction of Vitellogenin and Testis-Ova in Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 21: 1692-1698.

(9) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Maeda M, Tadokoro H and Kobayashi K. (2003). Fish Full Life-Cycle Testing for the Weak Estrogen 4-T*ert*-Pentylphenol on Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 22: 1487-1496.

(10) Hirai N, Nanba A, Koshio M, Kondo T, Morita M and Tatarazako N. (2006a). Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17β-Estradiol: Effect of Exposure Period on Spawning Performance in Sex-Transformed Females. Aquatic Toxicology 79: 288-295.

(11) Hirai N, Nanba A, Koshio M, Kondo T, Morita M and Tatarazako N. (2006b). Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17β-Estradiol: Formation of Testis-Ova and Sex-Transformation During Early-Ontogeny. Aquatic Toxicology 77: 78-86.

(12) Nakamaura A, Tamura I, Takanobu H, Yamamuro M, Iguchi T and Tatarazako N. (2015). Fish Multigeneration Test with Preliminary Short-Term Reproduction Assay for Estrone Using Japanese Medaka (*Oryzias Latipes).* Journal of Applied Toxicology 35:11-23.

(13) U.S. Environmental Protection Agency (2013). Validation of the Medaka Multigeneration Test: Integrated Summary Report. Disponível em: http://www.epa.gov/scipoly/sap/meetings/2013/062513meeting.html.

(14) Adolfsson-Erici M, Åkerman G, Jahnke A, Mayer P and McLachlan M. (2012). A Flow-Through Passive Dosing System for Continuously Supplying Aqueous Solutions of Hydrophobic Chemicals to Bioconcentration and Aquatic Toxicity Tests. Chemosphere 86: 593-599.

▼**M8**

(15) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 23.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(16) Hutchinson TH., Shillabeer N., Winter MJ and Pickford DB. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. Review. Aquatic Toxicology 76: 69–92.

(17) Denny JS, Spehar RL, Mead KE and Yousuff SC. (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. US EPA/600/3--91/064.

(18) Koger CS, Teh SJ and Hinton DE. (1999). Variations of Light and Temperature Regimes and Resulting Effects on Reproductive Parameters in Medaka (*Oryzias Latipes*). Biology of Reproduction 61: 1287--1293.

(19) Kinoshita M, Murata K, Naruse K and Tanaka M. (2009). Medaka: Biology, Management, and Experimental Protocols, Wiley- Blackwell.

(20) Gormley K and Teather K. (2003). Developmental, Behavioral, and Reproductive Effects Experienced by Japanese Medaka in Response to Short-Term Exposure to Endosulfan. Ecotoxicology and Environmental Safety 54: 330-338.

(21) Capítulo C.15 do presente anexo: Ensaio de toxicidade de curto prazo nos peixes em estado embrionário e recém-nascidos.

(22) Capítulo C.37 do presente anexo: Ensaio a 21 dias em peixes: Despistagem a curto prazo de atividade estrogénica e androgénica e de inibição da aromatase.

(23) Capítulo C.41 do presente anexo, Ensaio de desenvolvimento sexual em peixes.

(24) Capítulo C.48 do presente anexo, Ensaio de reprodução a curto prazo em peixes.

(25) Capítulo C.47 do presente anexo, Ensaio de toxicidade nos primeiros estádios de vida em peixes.

(26) Capítulo C.49 do presente anexo, Ensaio de toxicidade aguda em embriões de peixe (FET).

(27) Wheeler JR, Panter GH, Weltje L and Thorpe KL. (2013). Test Concentration Setting for Fish *In Viv*o Endocrine Screening Assays. Chemosphere 92: 1067-1076.

(28) Tatarazako N, Koshio M, Hori H, Morita M and Iguchi T. (2004). Validation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Method for Vitellogenin in the Medaka. Journal of Health Science 50: 301-308.

(29) OECD (2015). Guidance Document on Medaka Histopathology Techniques and Evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 227). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(30) Nanda I, Hornung U, Kondo M, Schmid M and Schartl M. (2003). Common Spontaneous Sex-Reversed XX Males of the Medaka *Oryzias Latipes*. Genetics 163: 245–251.

(31) Shinomiya, A, Otake H. Togashi K. Hamaguchi S and Sakaizumi M. (2004). Field Survey of Sex-Reversals in the Medaka, *Oryzias Latipes*: Genotypic Sexing of Wild Populations, Zoological Science 21: 613--619.

(32) OECD (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (annexes to this publication exist as a separate document), OECD Publishing, Paris.

(33) Green JW, Springer TA, Saulnier AN and Swintek J. (2014). Statistical Analysis of Histopathology Endpoints. Environmental Toxicology and Chemistry 33: 1108-1116.

▼M8

Apêndice 1

DEFINIÇÕES

Comprimento à furca (CF): O comprimento medido da extremidade do focinho até à extremidade dos raios centrais da barbatana caudal, utilizado nos peixes quando é difícil perceber onde termina a coluna vertebral (www.fishbase.org).

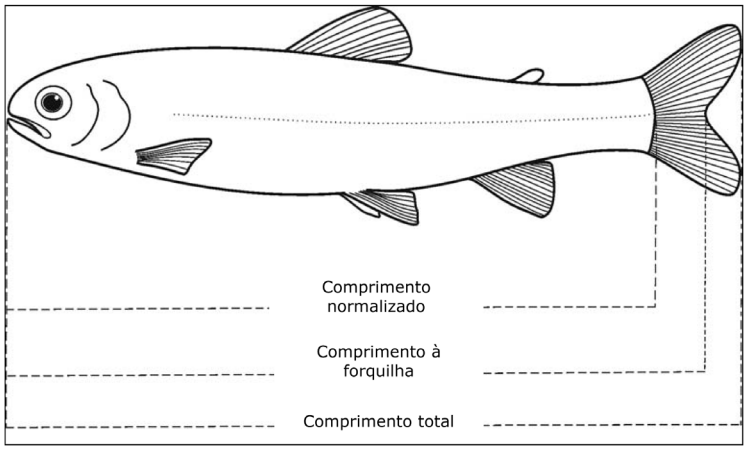
Comprimento normalizado (CN): O comprimento do peixe medido da extremidade do focinho até à extremidade posterior da última vértebra ou à extremidade posterior da parte lateral média da placa hipural. Por outras palavras, esta medida exclui o comprimento da barbatana caudal (www.fishbase.org).

Comprimento total (CT): O comprimento da extremidade do focinho até à extremidade do lobo mais longo da barbatana caudal, normalmente medido com os lobos espalmados no prolongamento da linha média. A medida faz-se em linha reta, sem seguir a curva do corpo (www.fishbase.org).

Uma imagem idêntica era apresentada na anterior alteração ao REG 440/2008 (ENV-2016-80003, parte 4), capítulo C.47, Apêndice 1, e pode ser reutilizada

Figura 1

Descrição dos diferentes comprimentos utilizados



CEx (Concentração efetiva com x % de efeito): concentração que causa efeitos em x % dos organismos sujeitos a ensaio num determinado período de exposição, comparativamente a um grupo de controlo. Por exemplo, a CE50 é a concentração estimada que produz efeitos num parâmetro do ensaio em 50 % de uma população exposta durante um determinado período de exposição.

Concentração mínima com efeito observável (LOEC): A menor concentração de ensaio de um produto químico em estudo para a qual se observa um efeito significativo (a $p < 0,05$), comparativamente com o controlo. No entanto, todas as concentrações de ensaio superiores à LOEC devem ter um efeito prejudicial igual ou superior aos observados com a LOEC. Quando estas duas condições não puderem ser satisfeitas, deverá ser fornecida uma explicação pormenorizada sobre a forma como se determinou a LOEC (e, consequentemente, a NOEC). Os apêndices 5 e 6 contêm orientações neste domínio.

Concentração letal média (CL50): A concentração de um produto químico em estudo que se estima ser letal para 50 % dos organismos sujeitos ao ensaio durante o ensaio.

▼M8

Concentração sem efeito observável (NOEC): A concentração de ensaio imediatamente abaixo da LOEC que, comparativamente ao grupo de controlo, não tem qualquer efeito estatisticamente significativo ($p < 0,05$), num determinado período de exposição.

Densidade de ocupação: Número de peixes por volume de água.

Ensaio de fluxo contínuo: Ensaio com fluxo contínuo de soluções de ensaio através do sistema de ensaio durante o período de exposição.

Eixo HHG: Eixo hipotálamo-hipófise-gonadal.

IACUC: Comité Institucional para o Cuidado e a Utilização de Animais.

IUPAC: União Internacional de Química Pura e Aplicada.

Produto químico: Uma substância ou mistura.

Produto químico em estudo: Qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado o presente método de ensaio.

SMILES: Especificação de escrita molecular linear simplificada (*Simplified Molecular Input Line Entry Specification*).

spf: Semanas após a fertilização.

Taxa de carga: Peso húmido de peixe por volume de água.

Taxa de eclosão: Número de alevins/embriões carregados numa incubadora

UVCB: Substâncias de composição desconhecida ou variável, produtos de reação complexos ou materiais biológicos.

VTG: A vitelogenina é uma fosfolipoglicoproteína precursora das proteínas do vitelo, que normalmente ocorre nas fêmeas sexualmente ativas de todas as espécies ovíparas.

▼**M8**

Apêndice 2

ALGUMAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DE UMA ÁGUA DE DILUIÇÃO ACEITÁVEL

Substância	Concentração limite
Partículas	5 mg/l
Carbono orgânico total	2 mg/l
Amoníaco não ionizado	1 µg/l
Cloro residual	10 µg/l
Pesticidas organofosforados totais	50 ng/l
Soma dos pesticidas organoclorados totais e dos bifenilos policlorados	50 ng/l
Cloro orgânico total	25 ng/l
Alumínio	1 µg/l
Arsénio	1 µg/l
Crómio	1 µg/l
Cobalto	1 µg/l
Cobre	1 µg/l
Ferro	1 µg/l
Chumbo	1 µg/l
Níquel	1 µg/l
Zinco	1 µg/l
Cádmio	100 ng/l
Mercúrio	100 ng/l
Prata	100 ng/l

▼**M8**

Apêndice 3

CONDIÇÕES DE ENSAIO PARA O MEOGRT

1. Espécie recomendada	Peixe-do-arroz-japonês (*Oryzias latipes*)
2. Tipo de ensaio	Fluxo contínuo
3. Temperatura da água	A temperatura nominal de ensaio é de 25 °C. A temperatura média durante o ensaio em cada cuba é de 24-26 °C.
4. Qualidade da iluminação	Lâmpadas fluorescentes (espetro largo e ~150 lúmenes/m^2) (~150 lux).
5. Fotoperíodo	16 h de luz e 8 h de escuridão
6. Taxa de carga	F0: 2 adultos/replicado; F1: iniciada com um máximo de 20 ovos (embriões)/replicado, reduzidos para 12 embriões/replicado na eclosão e, depois, 2 adultos (casal reprodutor XX-XY) às 9-10 spf para a fase de reprodução
7. Volume útil mínimo das câmaras de ensaio	1,8 l (exemplo de dimensão da câmara de ensaio: 18x9x15 cm)
8. Renovação da solução de ensaio, em volume	Máximo de 5 renovações em volume/dia até 16 renovações em volume/dia (ou débito de 20 ml/min)
9. Idade dos organismos de ensaio no início	F0: > 12 spf, não devendo, de preferência, exceder 16 spf
10. Número de organismos por replicado	F0: 2 peixes (par macho-fêmea); F1: máximo 20 peixes (ovos)/replicado (produzidos por casais reprodutores F0 e F1).
11. Número de tratamentos	5 tratamentos com o produto químico em estudo mais controlo(s) adequado(s)
12. Número de replicados por tratamento	Mínimo de 6 replicados por tratamento para o produto químico em estudo e mínimo de 12 replicados para o controlo, bem como para o controlo com solvente, se utilizado (o número de replicados é duplicado na fase de reprodução na geração F1)
13. Número de organismos por ensaio	Mínimo de 84 peixes na geração F0 e 504 na geração F1 (se for utilizado controlo com solvente, 108 peixes para F0 e 648 peixes para F1). A unidade contabilizada é o pós-eleuteroembrião.
14. Regime alimentar	Os peixes são alimentados *ad libitum* com *Artemia* spp. (náuplios com 24 horas de vida), complementadas, se necessário, com um alimento floculado disponível no mercado (o apêndice 6 contém um exemplo de um regime alimentar que garante um crescimento e um desenvolvimento adequados para uma reprodução sustentada).

▼**M8**

15. Arejamento	Nenhum, exceto se o oxigénio dissolvido se aproximar de valores < 60 % do valor de saturação no ar
16. Água de diluição	Água limpa de superfície, de poço ou reconstituída, ou água da torneira desclorada.
17. Período de exposição	Em princípio 19 semanas (da F0 à eclosão da F2)
18. Parâmetros biológicos (primários)	Taxa de eclosão (F1 e F2); sobrevivência (F1, desde a eclosão até 4 spf (fim das larvas/início dos juvenis), entre 4 e 9 (ou 10) spf (início de juvenis até subadultos) e entre 9 e 15 spf (de subadultos até à eutanásia dos adultos)); crescimento (F1, comprimento e peso às 9 e 15 spf); características sexuais secundárias (F1, papilas da barbatana anal às 9 e 15 spf); vitelogenina (F1, ARNm *vtg* ou proteína VTG às 15 spf); sexo fenotípico (F1, via histologia das gónadas às 15 spf); reprodução (F0 e F1, fecundidade e fertilidade durante 21 dias); tempo até à desova (F1) e histopatologia (F1, gónada, fígado e rins às 15 spf)
19. Critérios de validade do ensaio	Oxigénio dissolvido ≥ 60 % do valor da saturação no ar; temperatura média da água de 24--26 °C durante todo o ensaio; reprodução bem-sucedida ≥ 65 % de fêmeas no(s) controlo(s); fecundidade média diária ≥ 20 ovos no(s) controlo(s); taxa de eclosão ≥ 80 % (média) nos controlos (em cada uma das gerações F1 e F2); sobrevivência após a eclosão até às 3 spf ≥ 80 % (média) e a partir das 3 spf até à eutanásia para a geração ≥ 90 % (média) nos controlos (F1), as concentrações do produto químico em estudo em solução devem ser mantidas satisfatoriamente dentro de um intervalo de ± 20 % em relação aos valores médios medidos.

▼M8

Apêndice 4

ORIENTAÇÕES SOBRE OS VALORES TÍPICOS OBTIDOS NOS CONTROLOS

Note-se que os valores seguintes obtidos nos controlos se baseiam num número limitado de estudos de validação, podendo ser alterados à luz da nova experiência adquirida.

Crescimento

O peso e o comprimento são medidos para todos os peixes amostrados às 9 (ou 10) e às 15 semanas pós-fecundação (spf). De acordo com este protocolo, o peso húmido previsto às 9 spf é de 85-145 mg, para os machos, e de 95-150 mg, para as fêmeas. O peso esperado às 15 spf é de 250-330 mg para os machos e de 280--350 mg para as fêmeas. Embora se possam registar desvios significativos em relação a estes intervalos para determinados peixes, um peso médio nos controlos que se afaste substancialmente destes intervalos, sobretudo se for inferior, sugere problemas relacionados com a alimentação, o controlo da temperatura, a qualidade da água, doenças ou uma combinação destes fatores.

Eclosão

A taxa de eclosão nos controlos é tipicamente de cerca de 90 %. No entanto, não são raros valores próximos dos 80 %. Uma taxa de eclosão inferior a 75 % pode indicar uma agitação insuficiente dos ovos durante o desenvolvimento ou cuidados insuficientes no seu manuseamento, como a remoção tardia dos ovos mortos, que leva a uma infestação fúngica.

Sobrevivência

As taxas de sobrevivência até às 3 spf após a eclosão e após 3 spf são, em geral, de 90 % ou mais para os controlos, mas não são excessivas as taxas de sobrevivência próximas dos 80 % nas fases iniciais de vida, para os controlos. As taxas de sobrevivência em controlos inferiores a 80 % são motivo de preocupação e podem indicar uma limpeza insuficiente dos aquários, conduzindo à perda de larvas por doença ou asfixia devido aos baixos níveis de oxigénio dissolvido. A mortalidade pode também resultar de lesões durante a limpeza das cubas e da perda de larvas no sistema de drenagem das cubas.

Gene da vitelogenina

Embora os níveis absolutos do gene da *vitelogenina* (*vtg*), expressos em cópias/ng de ARNm total, possam variar consideravelmente entre laboratórios devido aos procedimentos ou instrumentos utilizados, o rácio de *vtg* deve ser cerca de 200 vezes superior nas fêmeas de controlo em relação aos machos de controlo. Não é invulgar que este rácio atinja níveis de 1 000 a 2 000; contudo, rácios inferiores a 200 são suspeitos e podem indicar problemas de contaminação das amostras ou problemas ligados ao procedimento e/ou aos reagentes utilizados.

Características sexuais secundárias

Para os machos, o intervalo normal de características sexuais secundárias, definidas como o número total de segmentos com papilas nos raios da barbatana anal, é de 40-80 segmentos às 9-10 spf. Às 15 spf, o intervalo deve ser de cerca de 80-120, para os machos de controlo, e de 0, para as fêmeas de controlo. Por motivos não elucidados, em casos raros, alguns machos não apresentam papilas às 9 spf, mas como todos os machos de controlo desenvolvem papilas até às 15 spf, tal resulta provavelmente de um atraso no desenvolvimento. A presença de papilas nas fêmeas de controlo indica a presença de machos XX na população.

▼**M8**

Machos XX

A incidência normal de machos XX nos peixes de cultura parece ser, no máximo, da ordem dos 4 %, a 25 °C, aumentando a incidência com o aumento da temperatura. Devem tomar-se medidas para limitar a proporção de machos XX na população. Uma vez que a incidência destes parece ter um componente genético e é, por conseguinte, hereditária, um meio eficaz de reduzir a sua incidência na população consiste em vigiar a população da cultura e assegurar que os machos XX não são utilizados para reprodução.

Atividade de desova

A atividade de desova nos replicados de controlo deve ser monitorizada diariamente antes da avaliação da fecundidade. Os casais de controlo podem ser avaliados visualmente do ponto de vista qualitativo para evidência da atividade de reprodução. Às 12-14 spf, a maioria dos casais de controlo deve desovar. Um número reduzido de casais a desovar nesta altura indica possíveis problemas de saúde, maturidade ou bem-estar dos peixes.

Fecundidade

Às 12-14 spf, as fêmeas do peixe-do-arroz-japonês de boa saúde e bem alimentadas põem geralmente 15 a 50 ovos por dia. A produção de ovos recomendada para 16 dos 24 casais reprodutores de controlo (> 65 %) deve exceder os 20 ovos por casal, por dia, podendo atingir cerca de 40 ovos por dia. Uma produção inferior pode indicar problemas de imaturidade, de malnutrição ou de falta de saúde dos casais reprodutores.

Fertilidade

A percentagem de ovos férteis nos casais reprodutores de controlo é geralmente da ordem dos 90 %, não sendo raros valores de 95 % ou superiores. As taxas de fertilidade inferiores a 80 % nos ovos de controlo são suspeitas e podem indicar indivíduos não saudáveis ou condições de cultura inferiores ao desejável.

▼**M8**

Apêndice 5

EXEMPLO DE REGIME ALIMENTAR

O quadro 1 apresenta um regime alimentar que assegura um crescimento e um desenvolvimento adequados para uma reprodução sustentada. São aceitáveis eventuais desvios a este regime alimentar, mas recomenda-se que sejam testados para verificar se as taxas de crescimento e de reprodução são aceitáveis. Para aplicar o regime alimentar proposto, é necessário, antes do início do ensaio, determinar o peso enxuto de artémias por volume de pasta semilíquida das mesmas. Isso pode ser feito pesando um determinado volume desta pasta após tê-la secado durante 24 horas a 60 °C em recipientes previamente pesados. Para ter em conta o peso dos sais na pasta semilíquida, convém secar e pesar também um volume idêntico da solução salina utilizada na pasta semilíquida, e subtrair o peso do sal do peso obtido para a pasta de artémias seca. Uma alternativa consiste em filtrar e enxaguar as artémias com água destilada antes de as secar, eliminando assim a necessidade de medir o peso de uma amostra que contenha apenas sal. Esta informação é utilizada para converter as informações do quadro de peso enxuto de artémias em volume de puré semilíquido de artémias a administrar aos peixes. Além disso, recomenda-se que sejam pesadas, todas as semanas, as alíquotas de pasta de artémias para verificar se o peso enxuto administrado está correto.

Quadro 1

Exemplo de regime alimentar

Tempo (após a eclosão)	Artémias (mg peso enxuto/peixe/dia)
Dia 1	0,5
Dia 2	0,5
Dia 3	0,6
Dia 4	0,7
Dia 5	0,8
Dia 6	1,0
Dia 7	1,3
Dia 8	1,7
Dia 9	2,2
Dia 10	2,8
Dia 11	3,5
Dia 12	4,2
Dia 13	4,5
Dia 14	4,8
Dia 15	5,2
Dias 16-21	5,6

▼**M8**

Tempo (após a eclosão)	Artémias (mg peso enxuto/peixe/dia)
Semana 4	7,7
Semana 5	9,0
Semana 6	11,0
Semana 7	13,5
Semana 8-eutanásia	22,5

▼**M8**

Apêndice 6

EXEMPLOS DE CÂMARAS DE INCUBAÇÃO DE OVOS

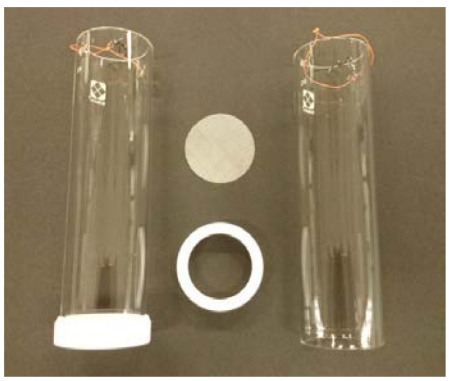
Exemplo A





Esta incubadora é constituída por um tubo de centrifugação de vidro com um corte transversal, ligado por uma manga de aço inoxidável e sustido pela tampa de rosca da centrifugadora. Um pequeno tubo em vidro ou em aço inoxidável atravessa a tampa e é posicionado perto do fundo redondo, garantindo uma difusão suave das bolhas de ar para colocar os ovos em suspensão e reduzir a transmissão entre os ovos de infeções fúngicas por organismos saprofíticos e facilitando simultaneamente as trocas químicas entre a incubadora e a cuba onde está colocada.

Exemplo B



▼**M8**



Esta incubadora é constituída por um corpo cilíndrico de vidro (5 cm de diâmetro e 10 cm de altura) e por uma grelha metálica em aço inoxidável (0,25 φ e 32 mesh), mantida no fundo do corpo cilíndrico com um anel em PTFE. As incubadoras são suspensas por uma barra de movimento vertical sobre as cubas e agitadas verticalmente (aproximadamente 5 cm de amplitude) num ciclo adequado aos ovos de peixe-do-arroz-japonês (aproximadamente uma vez a cada 4 segundos).

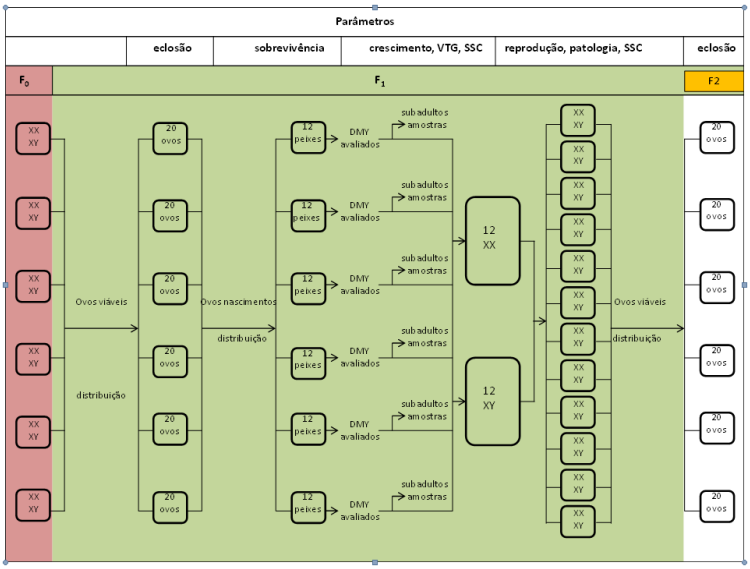
▼M8

Apêndice 7

DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DO AGRUPAMENTO E DA REPARTIÇÃO DE REPLICADOS DURANTE O MÉTODO DE ENSAIO MEOGRT

Figura 1

Agrupamento e repartição de replicados durante o MEOGRT. A figura representa um tratamento ou ½ controlo. Devido ao agrupamento, a identidade dos replicados não é contínua ao longo do ensaio. Note-se que o termo «ovos» designa ovos fecundados viáveis (equivalente a embriões)



Tratamentos e replicação

O presente método de ensaio recomenda cinco tratamentos com o produto químico em estudo utilizando material de qualidade técnica e um controlo negativo. O número de replicados por tratamento não se mantém constante ao longo do MEOGRT e o número de replicados no grupo de controlo é duas vezes mais elevado do que em qualquer um dos grupos de tratamento. Na geração F0, cada grupo tratado com o produto químico em estudo compreende seis replicados, ao passo que o grupo de controlo negativo tem 12 replicados. O recurso a solventes é fortemente desaconselhado, mas, se forem utilizados, essa utilização e a escolha do solvente devem justificar-se no relatório de ensaio. Além disso, se for utilizado um solvente, são necessários dois tipos de controlos: a) um controlo com solvente e b) um controlo negativo. Estes dois grupos de controlo devem conter, cada um deles, todos os replicados previstos nas diferentes etapas do ensaio MEOGRT. Esta estrutura de replicação permanece inalterada durante todo o desenvolvimento do organismo de ensaio na geração F1 (e F2 até a eclosão). No entanto, na fase adulta, quando os casais reprodutores F1 são constituídos, o número de replicados de casais reprodutores por tratamento deve ser duplicado para otimizar os resultados; por conseguinte, existem até 12 casais replicados por grupo tratado com o produto químico em estudo e 24 casais replicados no grupo de controlo (assim como 24 casais replicados no grupo de controlo com solvente, se necessário). A determinação da eclosão dos embriões reproduzidos pelos casais F1 é efetuada com base na mesma estrutura de replicação utilizada para os embriões dos casais F0, ou seja, inicialmente seis replicados por grupo tratado pelo produto químico em estudo e 12 replicados no(s) grupo(s) de controlo.

▼M8

Apêndice 8

CONTAGEM DAS PAPILAS DA BARBATANA ANAL

Principais materiais e reagentes

— Microscópio de dissecação (com câmara fotográfica facultativa);

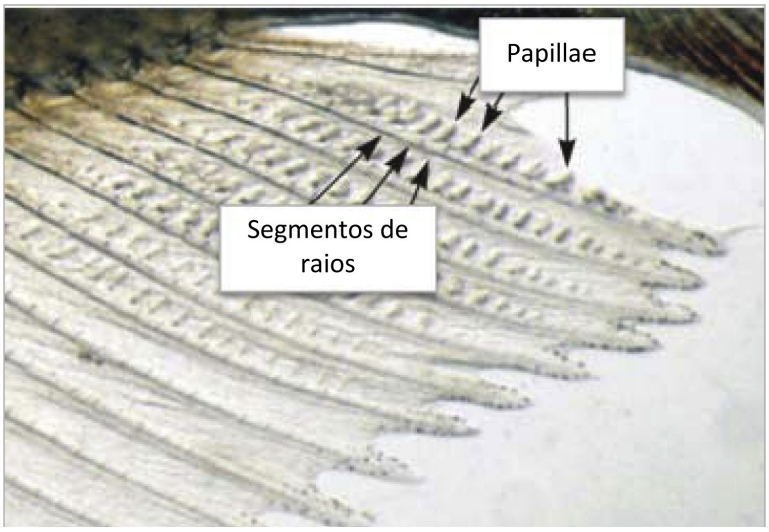
— Fixador (por exemplo, de Davidson (o líquido de Bouin não é recomendado), se a contagem não for efetuada por imagem

Procedimentos

Após a necrópsia, convém obter uma imagem da barbatana anal de modo a permitir a contagem conveniente das papilas. Embora a imagiologia seja o método recomendado, a barbatana pode ser fixada com fixador de Davidson ou outro fixador adequado, durante cerca de 1 minuto. É importante mantê-la espalmada durante a fixação, para facilitar a contagem das papilas. A carcaça com a barbatana anal pode ser armazenada em fixador de Davidson ou noutro fixador adequado, até ser analisada. Contar o número de placas de junção (ver **figura 1**) com papilas salientes ao nível do rebordo posterior da placa.

Figura 1

Papilas da barbatana anal



▼M8

Apêndice 9

CRONOLOGIA PORMENORIZADA DO ENSAIO MEOGRT

Semanas de ensaio 1-3 (F0)

Os peixes reprodutores da geração F0 que tenham cumprido os critérios de seleção (ver pontos 16 a 20) são expostos durante três semanas, para permitir a exposição dos gâmetas e dos tecidos gonadais em desenvolvimento ao produto químico em estudo. Cada cuba replicada contém um único casal reprodutor (casal fêmea XX-macho XY). Os ovos postos são recolhidos, contados e avaliados para efeitos de fertilidade durante 21 dias consecutivos, a partir do 1.º dia de ensaio.

Semana de ensaio 4 (F0 e F1)

É preferível que os ovos fecundados e viáveis (embriões) sejam recolhidos num único dia; no entanto, se não existirem embriões suficientes, podem ser recolhidos em dois dias. Neste caso, todos os embriões do mesmo tratamento que tenham sido recolhidos no primeiro dia são agrupados com os embriões recolhidos no segundo dia. Em seguida, a totalidade dos embriões agrupados para cada tratamento é distribuída aleatoriamente pelas incubadoras de replicação, a uma razão de 20 embriões por incubadora. A mortalidade dos ovos fecundados (embriões) é verificada e registada diariamente. Os ovos mortos são removidos das incubadoras (a morte de ovos fecundados pode ser identificada, em especial numa fase precoce, por uma diminuição acentuada da transparência e por uma alteração da coloração provocadas pela coagulação e/ou precipitação de proteínas, que se traduz num aspeto branco opaco; OCDE 2010).

Nota: Se um único tratamento exigir um segundo dia de colheita, todos os tratamentos (incluindo os controlos) têm de seguir este procedimento. Se, após o segundo dia de colheita, o número de embriões no âmbito de um tratamento não for suficiente para permitir colocar 20 embriões por incubadora, reduz-se para 15 o número de embriões por incubadora nesse tratamento específico. Se não houver embriões suficientes para colocar 15 por incubadora, reduz-se o número de incubadoras de replicação até que haja embriões em número suficiente para colocar 15 por incubadora. Além disso, é possível aumentar o número de casais reprodutores por tratamento e por grupo de controlo, na geração F0, para produzir mais ovos e alcançar o número recomendado de 20 por replicado.

No 24.º dia de ensaio, os casais reprodutores F0 são eutanasiados, registando-se o seu peso e o seu comprimento. Se necessário, é possível proporcionar mais um ou dois dias aos casais reprodutores F0, a fim de recomeçar a geração F1.

Semanas de ensaio 5-6 (F1)

Um ou dois dias antes do início previsto da eclosão, deve-se parar ou reduzir a agitação dos ovos em incubação para acelerar aquele processo. À medida que os ovos vão eclodindo, dia após dia, os alevins são agrupados por tratamento e distribuídos de forma sistemática pelas cubas de replicação destinadas às larvas no âmbito de cada tratamento específico, sendo que cada cuba não deve conter mais de 12 alevins. A distribuição é efetuada de forma aleatória; selecionam-se os alevins, que são colocados um a um em replicados sucessivos de forma aleatória e passando pela mesma ordem de um replicado de tratamento para o seguinte, até que todos os replicados no âmbito do tratamento tenham 12 alevins. Se não houver um número suficiente de alevins para preencher todos os replicados, é necessário garantir que o maior número possível de replicados contém 12 alevins para iniciar a fase F1.

Os ovos que não tenham eclodido ao fim de um período duplo do dia de eclosão médio no controlo são considerados não viáveis e rejeitados. O número de alevins é registado, calculando-se o êxito da eclosão (taxa de eclosão) em cada replicado.

▼M8

Semanas de ensaio 7-11 (F1)

A sobrevivência das larvas é controlada e registada diariamente em todos os replicados. Ao 43.º dia de ensaio, regista-se o número de peixes sobreviventes em cada replicado, bem como o número inicial de alevins colocados no replicado (valor nominal: doze). Deste modo, é possível calcular a percentagem de sobrevivência desde a eclosão até à fase subadulta.

Semana de ensaio 12 (F1)

Entre o 78.º e o 85.º dia de ensaio, retira-se uma pequena amostra da barbatana caudal de cada peixe para determinar o sexo genotípico do indivíduo. Estes dados são utilizados para constituir os casais reprodutores.

Nos três dias seguintes à determinação do sexo genotípico de cada peixe, constituem-se, aleatoriamente, 12 casais reprodutores por tratamento e 24 casais por controlo. Dois peixes XX e XY de cada replicado são selecionados aleatoriamente e agrupados por sexo e, em seguida, selecionados aleatoriamente para constituir os casais reprodutores (casais XX-XY). São constituídos, no mínimo, 12 replicados por tratamento e, no mínimo, 24 replicados para os controlos, com um casal reprodutor por replicado. Se, num replicado, não for possível agrupar dois peixes XX ou dois peixes XY, devem colocar-se peixes com o sexo genotípico adequado noutros replicados no âmbito do tratamento.

Os restantes peixes (máximo de 8 peixes por replicado) são eutanasiados e amostrados para a medição dos vários parâmetros na fase subadulta. Os dados relativos ao gene *dmy* (XX ou XY), para todas as amostras subadultas, são conservados com vista a garantir a possibilidade de associar todos os parâmetros medidos ao sexo genético de cada indivíduo.

Semanas de ensaio 13-14 (F1)

A exposição prossegue à medida que os casais reprodutores subadultos evoluem até à fase adulta. No 98.º dia de ensaio (ou seja, no dia anterior ao início da colheita dos ovos), os ovos são retirados dos aquários e das fêmeas.

Semanas de ensaio 15-17 (F1)

Os ovos postos são recolhidos diariamente durante 21 dias consecutivos em cada replicado e avaliados quanto à fecundidade e à fertilidade.

Semana de ensaio 18 (repetição da semana de ensaio 4) (F1 e F2)

No 120.º dia de ensaio, durante a manhã, procede-se à colheita dos ovos em cada cuba replicada. Os ovos recolhidos são avaliados e os ovos fecundados (filamentos removidos) de cada um dos casais reprodutores são agrupados por tratamento e distribuídos de forma sistemática pelas câmaras de incubação, com 20 ovos fecundados por incubadora. Estas podem ser colocadas em cubas para incubadoras, disponibilizadas para cada tratamento, ou na cuba replicada, que conterá as larvas após a eclosão. É preferível que os embriões sejam recolhidos num único dia; no entanto, se não existirem embriões suficientes, podem ser recolhidos em dois dias. Neste caso, todos os embriões do mesmo tratamento que tenham sido recolhidos no primeiro dia são agrupados com os embriões recolhidos no segundo dia. Em seguida, a totalidade dos embriões assim agrupados para cada tratamento é distribuída aleatoriamente pelas incubadoras de replicação, a uma razão de 20 embriões por incubadora. Se um único tratamento exigir um segundo dia de colheita, todos os tratamentos (inclusive os controlos) têm de seguir este procedimento. Se, após o segundo dia de colheita, o número de embriões no âmbito de um tratamento não for suficiente para permitir colocar 20 embriões por

▼M8

incubadora, reduz-se para 15 o número de embriões nesse tratamento específico. Se não houver embriões suficientes para carregar 15 por incubadora, reduz-se o número de incubadoras de replicação até que haja embriões suficientes para carregar 15 por incubadora.

No 121.º dia de ensaio (ou no 122.º dia de ensaio, para garantir o início correto da F2), os casais reprodutores F1 são eutanasiados e analisados quanto aos parâmetros na fase adulta. Se necessário, é possível proporcionar mais um ou dois dias aos casais reprodutores F1, a fim de recomeçar a geração F2.

Semanas de ensaio 19-20 (F2)

Um ou dois dias antes do início previsto da eclosão, deve-se parar ou reduzir a agitação dos ovos em incubação para acelerar aquele processo. Se o ensaio terminar com a eclosão da geração F2, os alevins são contados todos os dias e rejeitados. Os embriões que não tenham eclodido após um período de incubação prolongado, definido como duas vezes o tempo médio da eclosão nos controlos, são considerados não viáveis.

▼**M8**

Apêndice 10

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os tipos de dados biológicos gerados aquando do ensaio MEOGRT não são específicos deste ensaio; com exceção dos dados de patologia, foram desenvolvidos muitos métodos estatísticos adequados para analisar corretamente dados semelhantes em função das respetivas características, incluindo a normalidade, a homogeneidade da variância, se a conceção do estudo se presta a testes de hipótese ou análises de regressão, ensaios paramétricos *versus* ensaios não paramétricos, etc. Regra geral, as análises estatísticas propostas respeitam as recomendações da OCDE em matéria de dados de ecotoxicidade (OCDE 2006). A figura 2 apresenta um fluxograma decisional para a análise dos dados do ensaio MEOGRT.

Parte-se do princípio de que, na maior parte dos casos, os conjuntos de dados proporcionam respostas monótonas. Além disso, há que ponderar se deve ser utilizado um teste estatístico unilateral ou um teste estatístico bilateral. Sugere-se a utilização de testes unilaterais, a menos que isso não seja adequado por motivos biológicos. Embora a secção seguinte recomende determinados testes estatísticos específicos, se forem estabelecidos métodos estatísticos mais adequados e/ou potentes para aplicação aos dados específicos gerados pelo MEOGRT, esses testes estatísticos devem ser utilizados para beneficiar das vantagens que apresentam.

Os dados MEOGRT devem ser analisados separadamente para cada sexo genotípico. Existem duas estratégias para analisar os dados relativos aos peixes que apresentem inversão sexual (machos XX ou fêmeas XY): 1) Excluir todos os dados relativos aos peixes que apresentem uma inversão sexual ao longo de todo o ensaio, exceto no que se refere à prevalência da inversão sexual em cada replicado; 2) Conservar os dados relativos aos peixes que apresentem uma inversão sexual e proceder à análise com base no sexo genotípico.

Dados histopatológicos

Os dados histopatológicos são registados sob a forma de índices de gravidade, que são avaliados utilizando um procedimento estatístico recentemente desenvolvido – *Rao-Scott Cochrane-Armitage by Slices* (RSCABS) (Green *et al*., 2014). O ajustamento *Rao-Scott* retém a informação relativa à replicação do ensaio; o procedimento *by Slices* incorpora o pressuposto biológico de que a gravidade dos efeitos tende a aumentar com as concentrações de exposição. Para cada diagnóstico, os resultados do RSCABS indicam os tratamentos que induzem uma prevalência de patologias acrescida em relação aos controlos, bem como o respetivo o grau de gravidade.

Dados relativos à fecundidade

A análise dos dados relativos à fecundidade consiste num procedimento descendente (teste de Jonckheere-Terpstra ou de Williams) para determinar os efeitos do tratamento, desde que os dados sejam compatíveis com uma relação concentração-resposta monótona. O procedimento descendente permite fazer comparações a um nível de significância de 0,05, evitando os ajustamentos ligados ao número de comparações efetuadas. Espera-se que os dados sejam compatíveis com uma relação concentração-resposta monótona, o que pode verificar-se quer através de uma inspeção visual dos dados, quer através da construção de contrastes lineares e quadráticos das médias por tratamento, após uma hierarquização dos dados. A menos que o contraste quadrático seja significativo e o contraste linear não o seja, realiza-se um ensaio de tendências. Caso contrário, recorre-se ao teste de Dunnett para determinar os efeitos dos tratamentos se os dados apresentarem uma distribuição normal e variâncias homogéneas. Se estes requisitos não forem cumpridos, utiliza-se o teste de Dunn com um ajustamento de Bonferonni-Holm. Todos os ensaios são realizados independentemente do teste global F ou de Kruskal-Wallis. Para mais informações, consultar o documento OCDE 2006.

▼M8

Podem utilizar-se métodos alternativos, como um modelo linear generalizado com erros de Poisson para as contagens de ovos (sem transformação), desde que isso se justifique do ponto de vista estatístico (Cameron e Trividi, 2013). Neste caso, recomenda-se o recurso a um especialista em estatística.

Contagem diária de ovos numa única geração

O modelo ANOVA traduz-se na expressão Y = tempo*tempo+tratamento + *tratamento + tempo*tratamento + *tempo*tratamento, com os efeitos aleatórios do replicado (geração*tratamento) e tempo*replicado(tratamento), permitindo diferenças componentes de variâncias desiguais de ambos os tipos entre gerações. O termo «tempo» refere-se à frequência das contagens dos ovos (por exemplo, dia ou semana). Trata-se de uma análise de medidas repetidas, em que a correlação entre as observações realizadas com os mesmos replicados dá conta da natureza dos dados enquanto medidas repetidas.

Os principais efeitos dos tratamentos são submetidos ao teste de Dunnett (ou Dunnet-Hsu), que permite ajustar o número de comparações. Estes ajustamentos são necessários para os fatores geração e tempo, uma vez que nenhum deles está associado ao nível do «controlo» e cada par de níveis é potencialmente interessante em termos de comparação. Em ambos os casos, se o teste F para o efeito principal for significativo ao nível 0,05, as comparações por pares entre níveis desse fator podem ser testadas ao nível 0,05 sem ajustamentos suplementares.

O modelo inclui interações a dois ou três fatores, pelo que um efeito principal para o tempo, por exemplo, pode não ser significativo, mesmo que o tempo tenha um impacto significativo nos resultados. Assim, se uma interação a dois ou três fatores que inclua o tempo for significativa ao nível 0,05, podem aceitar-se comparações de níveis de tempo ao nível de significância de 0,05 sem ajustamentos suplementares.

Seguem-se os testes F para a significância do tratamento no tempo, ou seja, as chamadas «fatias» (*slices*) no quadro ANOVA. Se, por exemplo, a fatia correspondente ao tratamento aplicada à geração F1 e ao tempo 12 for significativa ao nível 0,05, as comparações por pares dos tratamentos aplicados à geração F1 e ao tempo 12 podem ser aceites ao nível 0,05 sem mais ajustamentos. Aplicam-se regras semelhantes aos testes relativos ao tempo na geração F1 no âmbito de um tratamento, ou à geração associada a um tempo e a um determinado tratamento.

Por último, as comparações não abrangidas por nenhuma das categorias supramencionadas devem ser ajustadas pelo método de ajustamento dos valores p de Bonferroni-Holm. Para mais informações sobre a análise com esses modelos, consultar Hocking (1985) e Hochberg e Tamhane (1987).

Outro método consiste em recolher os dados brutos e apresentá-los, no relatório do estudo, na forma de fecundidade (número de ovos) por replicado e por dia. Calcula-se a média dos dados brutos por replicado, aplicando-se em seguida, uma transformação de raiz quadrada. Calcula-se uma ANOVA unidirecional aplicada às médias transformadas por replicado, seguida dos contrastes de Dunnett. Pode também ser útil inspecionar visualmente os dados da fecundidade de cada tratamento e/ou replicado num gráfico de pontos que represente a distribuição dos dados ao longo do tempo. Este método permitirá uma avaliação informal dos efeitos potenciais ao longo do tempo.

Todos os outros dados biológicos

As análises estatísticas baseiam-se no pressuposto de que, com uma seleção adequada das doses, os dados serão monótonos. Assim, os dados são assumidos como monótonos, monotonia essa que é formalmente avaliada por recurso a contrastes lineares e quadráticos. Se os dados forem monótonos, recomenda-se a realização de um teste de tendência de Jonckheere-Terpstra sobre as medianas dos replicados (conforme aconselhado em OCDE 2006). Se o contraste quadrático for significativo e o contraste linear não o for, os dados são considerados não monótonos.

▼M8

Se os dados não forem monótonos, nomeadamente devido a uma resposta reduzida para o tratamento mais elevado ou os dois tratamentos mais elevados, deve ponderar-se excluir todo conjunto de dados, sendo a análise seja efetuada sem esses tratamentos. A decisão terá de ser tomada com base em critérios profissionais e relativamente a todos os dados disponíveis, em especial aqueles que indiquem toxicidade manifesta aos níveis de tratamento em causa.

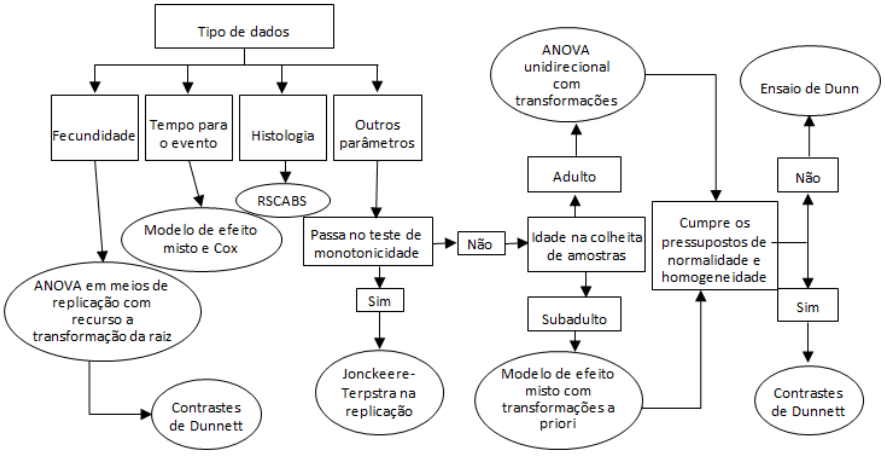
Quanto ao peso e ao comprimento, não são recomendadas transformações, embora possam ser ocasionalmente necessárias. No entanto, recomenda-se aplicar uma transformação logarítmica aos dados relativos à vitelogenina, uma transformação de raiz quadrada aos dados das CSS (papilas da barbatana anal) e uma transformação de arco seno da raiz quadrada aos dados relativos à taxa de eclosão, à percentagem de sobrevivência, ao rácio sexual e à percentagem de ovos férteis. O tempo até à eclosão e o tempo até à primeira desova devem ser tratados como tempo até ao evento, e os embriões que não ecludam no período definido, bem como os replicados que nunca desovam, devem ser tratados como dados censurados à direita. O tempo até à eclosão deve calcular-se a partir do dia mediano de eclosão de cada replicado. Estes parâmetros devem ser analisados com um modelo de riscos proporcionais de Cox para efeitos mistos.

Os dados biológicos de amostras de adultos são medidos uma vez por replicado, dado existir um peixe XX e um peixe XY por aquário replicado. Por conseguinte, recomenda-se que se aplique uma ANOVA unidirecional às médias dos replicados. Se se verificarem os pressupostos da ANOVA (normalidade e homogeneidade das variâncias – avaliadas, no que diz respeito aos resíduos da ANOVA, pelo teste de Shapiro-Wilks e o teste de Levene, respetivamente), devem utilizar-se os contrastes de Dunnett para determinar os tratamentos que diferem do controlo. Por outro lado, se os pressupostos da ANOVA não se verificarem, deve recorrer-se a um teste de Dunn para determinar que tratamentos diferiram do controlo. Recomenda-se um procedimento semelhante para os dados na forma de percentagens (fertilidade, eclosão e sobrevivência).

Os dados biológicos das amostras de subadultos têm entre 1 e 8 medições por replicado, pelo que podem existir números variáveis de indivíduos que contribuem para a média do replicado de cada sexo genotípico. Por conseguinte, recomenda-se a utilização de um modelo ANOVA com efeitos mistos, seguido de contrastes de Dunnett, caso se verifiquem os pressupostos em matéria de normalidade e de homogeneidade das variâncias (no que diz respeito aos resíduos da ANOVA com efeitos mistos). Se tal não for o caso, deve proceder-se a um teste de Dunn para determinar os tratamentos que diferiram do controlo.

Figura 2

Fluxograma relativo aos procedimentos estatísticos recomendados para a análise dos dados MEOGRT



▼M8

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(1) OECD (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (annexes to this publication exist as a separate document), OECD Publishing, Paris.

(2) Cameron AC and Trivedi PK (2013). Regression Analysis of Count Data, 2nd edition, Econometric Society Monograph No 53, Cambridge University Press.

(3) Hocking RR (1985). The Analysis of Linear Models, Monterey, CA: Brooks/Cole.

(4) Hochberg Y and Tamhane AC (1987). Multiple Comparison Procedures. John Wiley and Sons, Nova Iorque. [[G1]]

▼M8

C.53. ENSAIO DE CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO DE LARVAS DE ANFÍBIOS (LAGDA)

INTRODUÇÃO

1. O presente método de ensaio é equivalente às orientações de ensaio n.º 241 da OCDE (2015). A necessidade de desenvolver e validar um ensaio capaz de identificar e caracterizar as consequências negativas da exposição a produtos químicos tóxicos nos anfíbios surgiu da preocupação de que os níveis ambientais dos produtos químicos possam causar efeitos nocivos nos seres humanos e na fauna selvagem. As orientações de ensaio da OCDE sobre o Ensaio de Crescimento e Desenvolvimento de Larvas de Anfíbios (LAGDA) descrevem um ensaio de toxicidade, realizado com uma espécie de anfíbios, que estuda o crescimento e o desenvolvimento desde a fecundação até ao período juvenil precoce. Trata-se de um ensaio – normalmente com a duração de 16 semanas – que avalia o desenvolvimento inicial, a metamorfose, a sobrevivência, o crescimento e a maturação parcial do sistema reprodutor. Permite, além disso, medir um conjunto de outros parâmetros com vista a uma avaliação diagnóstica de produtos químicos suspeitos de serem perturbadores endócrinos ou de outros tipos de substâncias com efeitos tóxicos para o desenvolvimento e para a reprodução. O método descrito no presente documento é inspirado em trabalhos de validação realizados sobre a rã-de-unhas-africana (*Xenopus laevis*) pela Agência de Proteção do Ambiente dos EUA (U.S. EPA), em cooperação com o Japão (1). Embora outras espécies de anfíbios possam ser adequadas a um protocolo de ensaio sobre o crescimento e o desenvolvimento com capacidade para determinar se o sexo genético é um elemento importante, os métodos e parâmetros específicos descritos no presente método de ensaio são aplicáveis apenas a *Xenopus laevis*.

2. O LAGDA é utilizado como ensaio de nível superior no anfíbio para recolher informações mais abrangentes sobre as relações concentração-resposta em matéria de efeitos nocivos, efeitos esses que podem ser úteis para a identificação e a caracterização dos perigos e para a avaliação do risco ecológico. O ensaio enquadra-se no nível 4 do Quadro Conceptual da OCDE para o Ensaio e a Avaliação de Desreguladores Endócrinos, uma vez que os ensaios *in vivo* também fornecem dados sobre efeitos nocivos com base nos parâmetros pertinentes do sistema endócrino (2). O plano experimental genérico implica a exposição de embriões de *X. laevis* na fase de desenvolvimento 8-10 de Nieuwkoop e Faber (NF) (3) a um mínimo de quatro concentrações diferentes do produto químico em estudo (geralmente espaçadas por intervalos definidos segundo uma progressão não logarítmica) e a um ou mais controlos, até 10 semanas após o tempo médio até à fase NF62 no controlo, com uma subamostra provisória na fase NF62 (≤ 45 dias pós-fecundação; normalmente cerca de 45 dpf). Cada concentração de ensaio é testada em quatro replicados, com oito replicados para controlo. Os parâmetros avaliados durante a exposição (na subamostra provisória e na amostra final no termo do ensaio) incluem os valores indicativos de toxicidade generalizada: mortalidade, comportamento anormal e determinantes de crescimento (comprimento e peso), bem como parâmetros destinados a caracterizar mecanismos de ação específicos dos desreguladores endócrinos que visam os processos fisiológicos mediados por estrogénios, por androgénios e pela tiroide. O método focaliza-se nos potenciais efeitos relevantes para uma população (nomeadamente impactos negativos na sobrevivência, no desenvolvimento, no crescimento e no desenvolvimento do sistema reprodutor), para calcular uma concentração sem efeitos observáveis (NOEC) ou uma concentração efetiva que provoca × % de mudança (CEx) no parâmetro medido. Importa notar que as abordagens do tipo CEx só raramente são adequadas para grandes estudos deste tipo, em que o aumento do número de concentrações de ensaio para determinar a CEx desejada pode ser inviável. De salientar também que o método não abrange a fase de reprodução propriamente dita. As definições utilizadas constam do apêndice 1.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E LIMITAÇÕES

3. Devido ao número limitado de produtos químicos testados e de laboratórios envolvidos na validação deste método de ensaio bastante complexo, sobretudo no que respeita à reprodutibilidade interlaboratorial – que ainda não se

▼M8

encontra documentada com dados experimentais –, prevê-se que, quando estiver disponível um número suficiente de trabalhos para determinar o impacto desta nova conceção, as orientações de ensaio 241 da OCDE serão reexaminadas e, se necessário, atualizadas à luz da experiência adquirida. O LAGDA é um ensaio importante que permite estudar os fatores suscetíveis de contribuir para um declínio da população de anfíbios, avaliando os efeitos da exposição a produtos químicos durante a fase larvar, em que os efeitos na sobrevivência e no desenvolvimento, incluindo o desenvolvimento normal dos órgãos reprodutores, podem ter consequências nocivas nas populações.

4. O ensaio foi concebido para detetar o(s) efeito(s) apical(is) resultante(s) de mecanismos endócrinos e não endócrinos, e inclui parâmetros de diagnóstico que são, em parte, específicos dos principais mecanismos endócrinos. Importa notar que, até ao desenvolvimento do LAGDA, não existia nenhum ensaio validado que incidisse nesta função, para os anfíbios.

5. Antes do início do ensaio, é importante dispor de informações sobre as propriedades físico-químicas do produto químico em estudo, nomeadamente para garantir a estabilidade das soluções químicas produzidas. É também necessário dispor de um método analítico suficientemente sensível para verificar as concentrações do produto químico em estudo. O ensaio dura cerca de 16 semanas e requer um total de 480 animais, nomeadamente embriões de *X. laevis* (ou 640 embriões, caso se utilize um controlo com solvente), para garantir que é suficientemente representativo para avaliar os parâmetros ao nível da população, como o crescimento, o desenvolvimento e a maturação do sistema reprodutor.

6. Antes de utilizar o presente método de ensaio para testar uma mistura para fins regulamentares, convém averiguar se os resultados serão aceitáveis para a finalidade regulamentar pretendida. Além disso, o ensaio não avalia diretamente a fecundidade, podendo, por isso, não ser adequado para utilização numa fase mais avançada do que o nível 4 do Quadro Conceptual da OCDE para o Ensaio e a Avaliação de Desreguladores Endócrinos.

BASE CIENTÍFICA DO MÉTODO DE ENSAIO

7. Grande parte dos conhecimentos atuais sobre a biologia dos anfíbios foi obtida utilizando a espécie de laboratório modelo *X. laevis*. Esta espécie pode ser cultivada por rotina em laboratório; a ovulação pode ser induzida por gonadotropina coriónica humana (hCG) e é possível obter facilmente animais no comércio.

8. Tal como acontece com todos os vertebrados, a reprodução em anfíbios é controlada pelo eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (4). Os estrogénios e os androgénios são mediadores deste sistema endócrino, controlando o desenvolvimento e a fisiologia dos tecidos sexualmente dimórficos. O ciclo de vida dos anfíbios divide-se em três fases distintas, durante as quais este eixo é particularmente ativo: (1) diferenciação das gónadas durante o desenvolvimento larvar, (2) desenvolvimento das características sexuais secundárias e maturação das gónadas durante a fase juvenil e (3) reprodução funcional dos adultos. Em cada uma destas três fases de desenvolvimento, o sistema endócrino é suscetível de ser perturbado por determinados produtos químicos, como estrogénios e androgénios, o que resulta, *in fine*, numa diminuição da capacidade reprodutiva dos organismos.

9. As gónadas começam a desenvolver-se na fase NF43, altura em que se forma a crista genital bipotencial. A diferenciação das gónadas começa na NF52, quando as células germinais primordiais migram para o tecido medular (machos) ou

▼M8

permanecem na região cortical (fêmeas) das gónadas em desenvolvimento (3). Na década de 1950, foi referido pela primeira vez que este processo de diferenciação sexual das gónadas de *Xenopus* é suscetível de ser alterado pela ação de produtos químicos (5) (6). A exposição dos girinos ao estradiol durante o período de diferenciação das gónadas provoca uma alteração do sexo nos machos, que se tornam fêmeas plenamente funcionais quando chegam à idade adulta (7) (8). A inversão funcional do sexo das fêmeas em machos também é possível, tendo sido referida a sua ocorrência após a implantação de tecido testicular em girinos (9). No entanto, embora a exposição a um inibidor da aromatase provoque também uma inversão do sexo funcional em *X. tropicalis* (10), este efeito não foi constatado em *X. laevis*. Tradicionalmente, os efeitos de produtos tóxicos na diferenciação das gónadas eram avaliados através do exame histológico das gónadas no momento da metamorfose e a inversão do sexo só podia ser determinada pela análise dos rácios sexuais. Até há pouco tempo, não havia forma de determinar diretamente o sexo genético de *Xenopus*. No entanto, a criação recente de marcadores sexuais em *X. laevis* permite determinar o sexo genético e identificar diretamente os animais cujo sexo foi invertido (11).

10. Nos machos, o desenvolvimento juvenil acompanha o aumento dos níveis de testosterona no sangue, correspondente ao desenvolvimento de características sexuais secundárias, bem como ao desenvolvimento dos testículos. Nas fêmeas, o estradiol é produzido pelos ovários, o que resulta no aparecimento de vitelogenina (VTG) no plasma e de ovócitos vitelogénicos no ovário, assim como no desenvolvimento dos ovidutos (12). Os ovidutos são características sexuais secundárias femininas que intervêm na maturação dos ovócitos durante a reprodução. Os ovócitos são cobertos por um revestimento gelatinoso quando passam pelo oviduto e acumulam-se no ovissaco, prontos para serem fecundados. O desenvolvimento do oviduto parece ser regulado pelos estrogénios, uma vez que está correlacionado com os níveis de estradiol no sangue de *X. laevis* (13) e *X. tropicalis* (12). Foi referido o desenvolvimento de ovidutos nos machos expostos a bifenilos policlorados (14) e 4-*terc*-octilfenol (15).

PRINCÍPIO DO ENSAIO

11. A conceção do ensaio implica expor os embriões de *X. laevis* na fase NF8--10, por via aquática, a quatro concentrações diferentes do produto químico em estudo e a um ou mais controlos até 10 semanas após o tempo médio necessário para atingir a fase NF62 no controlo, com uma subamostra intermédia na fase NF62. Embora também seja possível administrar produtos químicos altamente hidrófobos através da alimentação, até à data esta via de exposição foi pouco explorada no contexto do presente ensaio. Cada concentração é testada em quatro replicados, com oito replicados para cada controlo utilizado. Os parâmetros avaliados durante a exposição incluem os indicadores de toxicidade generalizada – mortalidade, comportamento anormal e determinantes de crescimento (comprimento e peso) –, bem como parâmetros concebidos para caracterizar os mecanismos de ação dos perturbadores endócrinos que visam processos fisiológicos mediados pelos estrogénios, pelos androgénios ou pela tiroide (histopatologia da tiroide, histopatologia das gónadas e do ducto gonadal, desenvolvimento anormal, vitelogenina plasmática – opcional – e rácios sexuais genotípicos/fenotípicos).

CRITÉRIOS DE VALIDADE DO ENSAIO

12. São aplicáveis os seguintes critérios de validade do ensaio:

— A concentração de oxigénio dissolvido deve ser ≥ 40 % do valor da saturação no ar, durante todo o ensaio;

▼**M8**

— A temperatura da água deve situar-se no intervalo de 21 ± 1 °C e os diferenciais entre replicados e entre tratamentos não devem exceder 1,0 °C;

— O pH da solução de ensaio deve ser mantido entre 6,5 e 8,5, e os diferenciais entre replicados e entre tratamentos não devem exceder 0,5;

— Os dados disponíveis devem demonstrar que as concentrações do produto químico em estudo em solução foram corretamente mantidas num intervalo de ± 20 % em relação à média dos valores medidos;

— A mortalidade durante o período de exposição deve ser ≤ 20 % em cada replicado, no que diz respeito aos controlos;

— A viabilidade deve ser ≥ 70 % na desova escolhida para dar início ao estudo;

— O tempo mediano até à fase NF62 nos controlos deve ser ≤ 45 dias.

— O peso médio dos organismos de ensaio na fase NF62 e no fim do ensaio, no âmbito dos controlos e dos controlos com solvente (se utilizado), deve atingir, respetivamente, 1,0 ± 0,2 e 11,5 ± 3 g.

13. Embora não seja um critério de validade, recomenda-se que estejam disponíveis para análise, pelo menos, três níveis de tratamento, com três replicados não comprometidos. Uma mortalidade excessiva, que compromete um tratamento, é definida como a ocorrência de mais de quatro mortes (> 20 %) que não possam ser explicadas por um erro técnico em, pelo menos, dois replicados. A análise deve incluir, pelo menos, três níveis de tratamento isentos de toxicidade manifesta. Os sinais de toxicidade manifesta podem incluir, entre outros, a flutuação à superfície, a imobilização no fundo do viveiro, natação invertida ou irregular, falta de atividade à superfície e ausência de reação aos estímulos, anomalias morfológicas (por exemplo, deformidades nos membros), lesões hemorrágicas e edema abdominal.

14. Caso se observem desvios em relação aos critérios de validade do ensaio, devem ponderar-se as consequências no respeitante à fiabilidade dos resultados do ensaio, devendo esses desvios e a respetiva apreciação ser incluídos no relatório de ensaio.

DESCRIÇÃO DOS MÉTODOS

Equipamento

15. Equipamento normal de laboratório, designadamente o seguinte:

a) Aparelhos de controlo da temperatura (por exemplo, aquecedores ou refrigeradores reguláveis a 21 ± 1 °C);

▼M8

b) Termómetro;

c) Microscópio binocular de dissecação e ferramentas de dissecação;

d) Máquina fotográfica digital com resolução mínima de 4 megapixels e função micro (se necessário);

e) Balança analítica com precisão de 0,001 mg ou 1 μg;

f) Medidor de oxigénio dissolvido e medidor de pH;

g) Aparelho de medição da intensidade luminosa capaz de apresentar resultados em lux.

Água

Fonte e qualidade

16. Pode ser utilizada qualquer água de diluição disponível no local (por exemplo, água de nascente ou água da torneira filtrada com carvão) e permita o crescimento e desenvolvimento normais de *X. laevis*, devendo dispor-se de informações concretas que demonstrem o crescimento normal nesta água. Uma vez que a qualidade da água local pode diferir substancialmente de uma zona para outra, é necessário analisá-la, sobretudo no caso de não se dispor de dados históricos sobre a utilização da mesma na criação de larvas de anfíbios. Importa determinar o teor de metais pesados (Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni, etc.), dos principais aniões e catiões (Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, SO_4^{2-}, etc.), de pesticidas, de carbono orgânico total e de sólidos em suspensão antes de iniciar o ensaio e/ou, por exemplo, de seis em seis meses, caso se saiba que a qualidade da água de diluição se mantém relativamente constante. No apêndice 2 apresentam-se algumas características químicas de uma água de diluição aceitável.

Concentração de iodeto na água utilizada no ensaio

17. Para que a glândula tiroide sintetize as hormonas que favorecem uma metamorfose normal, as larvas devem dispor de quantidades suficientes de iodeto proveniente de uma combinação de fontes aquosas e alimentares. Atualmente, não existem orientações empíricas quanto às concentrações mínimas de iodeto nos alimentos ou na água necessárias para garantir um desenvolvimento adequado. No entanto, a disponibilidade de iodetos pode afetar a capacidade de resposta do sistema tiróideo aos agentes ativos da tiroide e sabe-se que influencia a atividade basal da glândula tiroide, aspeto a ter em conta na interpretação dos resultados histopatológicos relativos à tiroide. Em trabalhos anteriores, demonstrou-se o bom desempenho do ensaio com concentrações de iodeto de água de diluição (I^{-}) compreendidas entre 0,5 e 10 μg/l. Idealmente, a concentração de iodeto (adicionado sob a forma de sal de sódio ou de potássio) na água de diluição, durante todo o ensaio, deve ser de 0,5 μg/l. Se a água for obtida por reconstituição de água desionizada, é necessário adicionar iodo de modo a obter uma concentração deste não inferior a 0,5 μg/l. É necessário mencionar no relatório as concentrações de iodetos medidas na água utilizada no ensaio (a água de diluição), bem como a adição de iodo ou outros sais (se for o caso) àquela água. Além de ser medido na água, pode também medir-se o teor de iodo nos alimentos.

Sistema de exposição

18. O ensaio foi concebido utilizando um sistema de diluição com fluxo contínuo. Os componentes do sistema devem ser constituídos por um material adaptado ao contacto com a água, como o vidro, o aço inoxidável e/ou outros materiais quimicamente inertes. Os viveiros de exposição devem ser

▼M8

aquários de vidro ou de aço inoxidável com um volume útil compreendido entre 4,0 e 10,0 l (profundidade mínima da água de 10 a 15 cm). O sistema deve ser capaz de suportar todas as concentrações de exposição, um controlo e um controlo com solvente, se necessário, com quatro replicados por tratamento e oito replicados para os controlos. O caudal deve ser constante em cada viveiro, a fim de garantir a estabilidade das condições biológicas e da exposição química. Recomenda-se que os caudais sejam adequados (no mínimo, 5 renovações por dia) para evitar declínios da concentração do produto químico, devido ao metabolismo dos organismos de ensaio e dos microrganismos aquáticos presentes nos aquários ou nas vias abióticas de degradação (hidrólise, fotólise) ou de dissipação (volatilização, sorção). Os viveiros devem ser dispostos de forma aleatória no sistema de exposição, de modo a reduzir os possíveis efeitos decorrentes da posição, como ligeiras variações de temperatura, intensidade luminosa, *etc*. Para mais informações sobre a montagem de sistemas de exposição de fluxo contínuo, consultar o guia da ASTM intitulado *Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians* (16).

Introdução dos produtos químicos: preparação das soluções de ensaio

19. Para preparar as soluções de ensaio no sistema de exposição, convém introduzir neste uma solução-mãe do produto químico em estudo, com o auxílio de uma bomba adequada ou outro aparelho. O débito da solução-mãe deve ser calibrado de acordo com a confirmação analítica das soluções de ensaio antes do início da exposição, e deve ser objeto de controlo volumétrico periódico durante o ensaio. A solução de ensaio de cada viveiro deve ser renovada a uma taxa de pelo menos 5 renovações em volume/dia.

20. O método utilizado para introduzir o produto químico em estudo no sistema varia em função das suas propriedades físico-químicas. Por conseguinte, antes do ensaio, devem obter-se informações de base sobre o produto que sejam relevantes para determinar a sua testabilidade. No que respeita às propriedades específicas do produto químico em estudo, são úteis as seguintes informações: fórmula estrutural, peso molecular, pureza, estabilidade na água e à luz, pK_a e coeficiente de partição octanol-água, solubilidade em água (de preferência no meio de ensaio) e pressão de vapor, bem como os resultados de um ensaio de biodegradabilidade fácil – método de ensaio C.4 (17) ou C.29 (18). A solubilidade na água e a pressão de vapor podem ser utilizadas para calcular a constante de Henry, que indica os riscos de perda do produto químico em estudo por evaporação. A realização do ensaio sem as informações acima enumeradas deve ser objeto de uma ponderação cuidadosa, uma vez que a conceção do estudo dependerá das propriedades físico-químicas do produto químico em causa e que, sem estes dados, os resultados do ensaio podem ser difíceis de interpretar ou desprovidos de sentido. Para determinar a concentração do produto nas soluções de ensaio, deve dispor-se de um método de análise fiável, com uma previsão e um limite de deteção conhecidos e notificados. Os produtos químicos em estudo solúveis em água podem ser dissolvidos em alíquotas de água de diluição a uma concentração que permita alcançar a concentração de ensaio-alvo num sistema de fluxo contínuo. Os produtos químicos líquidos ou sólidos à temperatura ambiente e moderadamente solúveis na água podem necessitar de saturadores líquido:líquido ou líquido:sólido (por exemplo, coluna de lã de vidro) (19). Embora também seja possível administrar produtos químicos muito hidrófobos através da alimentação, esta via de exposição foi pouco explorada no presente ensaio.

21. As soluções de ensaio são ajustadas à concentração pretendida por diluição de uma solução-mãe. De preferência, a solução-mãe deve ser preparada por simples mistura ou agitação do produto químico em estudo na água de diluição, por meios mecânicos (agitação e/ou dispersão ultrassónica, por exemplo). Podem ser utilizadas colunas/sistemas de saturação ou métodos de dosagem passiva (20) para obter uma solução-mãe com a concentração pretendida. São preferíveis os sistemas desprovidos de veículos; no entanto,

▼M8

os diferentes produtos químicos em estudo devem possuir propriedades físico-químicas variadas, que irão provavelmente exigir abordagens diferentes para a preparação das soluções aquosas para exposição química. Devem ser envidados todos os esforços para evitar a utilização de solventes ou outros veículos, porque: 1) alguns solventes podem, por si mesmos, provocar toxicidade e/ou respostas indesejáveis ou inesperadas; 2) o ensaio de produtos químicos acima da sua solubilidade em água (passível de ocorrer frequentemente quando se utilizam solventes) pode resultar em determinações inexatas de concentrações efetivas; 3) a utilização de solventes pode resultar num grau significativo de formação de biofilmes decorrente da atividade microbiana, com possível impacto nas condições ambientais, bem como na capacidade de manter as concentrações de exposição; 4) na ausência de dados históricos que demonstrem que o solvente não influencia o resultado do estudo, a sua utilização exige um tratamento compatível com o bem-estar animal, uma vez que é necessário um número superior de animais para a realização do ensaio. Para os produtos químicos difíceis de ensaiar, é possível, em último recurso, utilizar um solvente – consultar o documento de orientações da OCDE sobre ensaios de toxicidade aquática de substâncias e misturas difíceis (21) para estabelecer o melhor método. A escolha do solvente será determinada pelas propriedades químicas do produto químico em estudo e pela existência de dados de controlos históricos sobre o solvente. Na ausência destes, é necessário determinar a pertinência do solvente antes da realização do estudo definitivo. Caso seja inevitável a utilização de um solvente e ocorra atividade microbiana (formação de biofilmes), recomenda-se o registo/a inclusão no relatório da presença de biofilme em cada cuba (pelo menos uma vez por semana) durante todo o ensaio. Idealmente, a concentração de solvente deve ser mantida constante no controlo com solvente e em todos os grupos de tratamento. Caso tal não suceda, deve-se utilizar no controlo com solvente a concentração mais elevada no tratamento de ensaio. Se o solvente for utilizado como veículo, as suas concentrações máximas não devem exceder 100 µl/l ou 100 mg/l (21), recomendando-se que se mantenha a concentração mais baixa possível (*por exemplo*, $\leq$ 20 µl/l), para evitar que o solvente influencie os parâmetros medidos (22).

Animais de ensaio

Espécie de ensaio

22. A espécie utilizada no ensaio é *X. laevis*, porque se trata de uma espécie: 1) criada por rotina em laboratórios de todo o mundo, 2) facilmente obtida no comércio; 3) cujo sexo genético pode ser determinado.

Cuidados e reprodução de adultos

23. Os métodos de cuidados e de reprodução adaptados a *X. laevis* são descritos num documento de orientação normalizada (23). As condições de alojamento e os cuidados a ter com *X. laevis* também são descritos por Read (24). Para induzir a reprodução, três a cinco pares de adultos machos e fêmeas recebem uma injeção intraperitoneal de gonadotropina coriónica humana (hCG). A dose injetada nas fêmeas e nos machos é de, aproximadamente, 800-1000 UI e 500-800 UI, respetivamente, de hCG dissolvida numa solução salina a 0,6--0,9 % (ou uma solução de Ringer isotónica salina, aplicável aos anfíbios). Os volumes injetados devem ser equivalentes a cerca de 10 µl/g de peso corporal (~1 000 µl). Em seguida, mantêm-se os casais reprodutores induzidos em grandes viveiros, ao abrigo de perturbações e em condições estáticas, de modo a estimular o amplexo. Cada viveiro de reprodução deve estar equipado com um fundo falso composto por uma rede em aço inoxidável (por exemplo, aberturas de 1,25 cm), para que os ovos possam cair para o fundo. As rãs injetadas com hCG no final da tarde põem normalmente a maior parte dos seus ovos até ao meio da manhã seguinte. Após a libertação e a fecundação de uma quantidade suficiente de ovos, os adultos devem ser retirados dos viveiros de reprodução. Os ovos são, em seguida, recolhidos e os revestimentos gelatinosos são removidos por tratamento com L-cisteína (23). Prepara-se uma solução de L-cisteína a 2 % e o pH é ajustado para 8,1 com NaOH 1 M. Esta solução a 21 °C é adicionada a um erlenmeyer de 500 ml que contenha os ovos de uma única desova, agitada cuidadosamente durante um a dois minutos e depois bem enxaguada, 6 a 8 vezes, com água de

▼M8

cultura a 21 °C. Os ovos são depois transferidos para um cristalizador e a sua viabilidade é determinada, devendo ser > 70 %, com anomalias mínimas nos embriões que apresentem divisão celular.

CONCEÇÃO DO ENSAIO

Concentrações de ensaio

24. Recomenda-se a utilização de, no mínimo, quatro concentrações do produto químico em estudo e de controlos adequados (incluindo controlos com solvente, se necessário). Regra geral, recomenda-se a separação das concentrações por um fator de espaçamento não superior a 3,2.

25. Para efeitos do presente ensaio, devem utilizar-se, na medida do possível, os resultados dos estudos existentes sobre os anfíbios para determinar a concentração mais elevada de ensaio, a fim de evitar concentrações manifestamente tóxicas. Podem contribuir para a definição desta concentração informações provenientes, por exemplo, de relações estrutura-atividade quantitativas, de referências cruzadas e de dados de estudos sobre anfíbios, como o ensaio da metamorfose dos anfíbios, o método de ensaio C.38 (25) e o *Frog Embryo Teratogenesis Assay - Xenopus* (23) e/ou ensaios em peixes, como os métodos de ensaio C.48, C.41 e C.49 (26) (27) (28). Antes da execução do LAGDA, pode realizar-se uma experiência de determinação do intervalo das concentrações. Recomenda-se começar esta experiência nas 24 horas que se seguem à fecundação e manter a exposição durante 7-14 dias (ou mais, se necessário), fixando as concentrações de ensaio de modo a que sejam espaçadas por um fator de 10. Os resultados da experiência de determinação do intervalo das concentrações devem servir para estabelecer a concentração de ensaio máxima no LAGDA. Note-se que, se for necessário utilizar um solvente, a respetiva pertinência (ou seja, a questão de saber se pode influenciar o resultado do estudo) pode ser avaliada no âmbito do estudo de determinação do intervalo de concentrações.

Replicados no âmbito dos grupos de tratamento e dos controlos

26. Deve usar-se um mínimo de quatro viveiros replicados por concentração de ensaio e um mínimo de oito replicados para os controlos (e para o controlo com solvente, se necessário), pelo que o número de replicados no controlo e o eventual controlo com solvente deve ser duas vezes superior ao número de replicados de cada grupo de tratamento, a fim de garantir uma representatividade estatística adequada). Cada replicado deve conter, no máximo, 20 animais. O número mínimo de animais tratados seria de 15 (5 para a subamostra na fase NF62 e 10 juvenis). No entanto, são adicionados animais suplementares a cada replicado, a fim de manter o número crítico de 15 em caso de mortalidade.

PROCEDIMENTO

Síntese do ensaio

27. O ensaio é iniciado com embriões recém-eclodidos (fase NF8-10) e continua até ao desenvolvimento dos juvenis. Os animais são examinados diariamente para detetar mortalidade e quaisquer sinais de comportamento anormal. Na fase NF62, é recolhida uma subamostra de larvas (até 5 animais por replicado) e são examinados vários parâmetros (quadro 1). Depois de todos os animais terem atingido a fase NF66, ou seja, a conclusão da metamorfose (ou após 70 dias a contar do início do ensaio, consoante o que ocorrer primeiro), é efetuada uma seleção aleatória – mas sem subamostragem –, a fim de reduzir o número de animais a 10 por tanque (ver ponto 43); os

▼M8

restantes animais continuam a ser expostos até 10 semanas após o tempo médio necessário para atingir a fase NF62 no controlo. No final do ensaio (amostragem juvenil) são efetuadas medições complementares (quadro 1).

Condições de exposição

28. O apêndice 3 contém um resumo completo dos parâmetros de ensaio. Durante o período de exposição, deve medir-se diariamente o oxigénio dissolvido, a temperatura e o pH das soluções de ensaio. A condutividade, a alcalinidade e a dureza são medidas uma vez por mês. No que diz respeito à temperatura da água das soluções de ensaio, os diferenciais entre replicados e entre tratamentos (no espaço de um dia) não devem exceder 1,0 °C. Além disso, no que se refere ao pH das soluções de ensaio, os diferenciais entre replicados e entre tratamentos não devem exceder 0,5.

29. As cubas de exposição podem ser sifonadas diariamente para remover os alimentos não consumidos e os produtos residuais, tendo o cuidado de evitar a contaminação cruzada das cubas. Convém procurar minimizar a tensão e o trauma dos animais, sobretudo durante as deslocações, a limpeza dos aquários e o manuseamento. Há que evitar situações e ações que possam gerar tensão, como ruídos fortes e/ou continuados, batimentos nos aquários ou vibrações nas cubas.

Duração da exposição ao produto químico em estudo

30. A exposição é iniciada com embriões recém-eclodidos (fase FN8-10) e prolonga-se até dez semanas após o tempo médio necessário para atingir a fase NF62 (≤ 45 dias a contar do início do ensaio) no grupo de controlo. Regra geral, a duração do LAGDA é de 16 semanas (máximo de 17 semanas).

Início do ensaio

31. Os animais progenitores utilizados para o início do ensaio devem ter previamente demonstrado que produzem descendência que pode ser geneticamente sexuada (apêndice 5). Após a desova dos adultos, os embriões são recolhidos, tratados com cisteína para remover o revestimento gelatinoso e selecionados em função da sua viabilidade (23). O tratamento com cisteína permite que os embriões sejam manuseados durante a seleção sem que adiram às superfícies. Esta é efetuada com o auxílio de um microscópio de dissecação, utilizando um conta-gotas de tamanho adequado para eliminar os embriões não viáveis. É preferível utilizar para o ensaio uma única desova que assegure uma viabilidade superior a 70 %. Os embriões na fase NF8-10 são distribuídos aleatoriamente por cubas de tratamento com um volume adequado de água de diluição, até que cada cuba contenha 20 embriões. Importa manusear os embriões com cuidado durante esta transferência, a fim de minimizar a tensão associada à manipulação e de evitar causar-lhes alguma lesão. Noventa e seis horas após a fecundação, os girinos devem ter subido ao longo da coluna de água e começado a agarrar-se às paredes da cuba.

Regime alimentar

32. O regime e a frequência de alimentação evoluem em função das fases de desenvolvimento de *X. laevis* e representam um aspeto muito importante do protocolo LAGDA. O excesso de alimentação durante a fase larvar conduz geralmente ao aumento da incidência e da gravidade da escoliose (apêndice 8), devendo ser evitado. Em contrapartida, a alimentação insuficiente durante a fase larvar resulta em taxas de desenvolvimento altamente variáveis entre os controlos, o que pode comprometer a representatividade estatística ou

▼M8

provocar confusão nos resultados dos ensaios. O apêndice 4 apresenta o regime alimentar recomendado para as larvas e os juvenis de *X. laevis* em condições de ensaio com fluxo contínuo, embora sejam admissíveis alternativas, desde que os organismos de ensaio cresçam e se desenvolvam de forma satisfatória. É importante notar que, caso estejam a ser medidos os parâmetros específicos do sistema endócrino, os alimentos devem ser isentos de substâncias ativas neste sistema, como a farinha de soja.

Alimentação das larvas

33. O regime alimentar recomendado para as larvas consiste em alimento inicial para trutas, discos de *Spirulina* e flocos para peixe-dourado (*por exemplo*, flocos TetraFin®, Tetra, Alemanha), misturados na água de cultura ou de diluição. Esta mistura é administrada três vezes por dia, nos dias úteis, e uma vez por dia, aos fins de semana. Os girinos são igualmente alimentados com náuplios de 24 horas de artémias vivas (*Artemia* spp.), duas vezes por dia, nos dias úteis, e uma vez por dia, aos fins de semana, a começar no dia 8 após a fecundação. A alimentação das larvas, que deve ser homogénea em cada cuba de ensaio, deve permitir o crescimento e o desenvolvimento adequados dos animais, a fim de assegurar a reprodutibilidade e a transferibilidade dos resultados do ensaio: 1) o tempo mediano até à fase NF62 nos controlos deve ser ≤ 45 dias; 2) recomenda-se um peso médio de 1,0 ± 0,2 g na fase NF62 nos controlos.

Alimentação dos juvenis

34. Uma vez concluída a metamorfose, o regime de alimentação é constituído por alimentos de primeira escolha para anfíbios, por exemplo Sinking Frog Food -3/32 (Xenopus Express, FL, EUA) (apêndice 4). Para as jovens rãs (juvenis precoces), os granulados são triturados brevemente num moinho de café ou numa misturadora ou esmagados com almofariz e pilão, a fim de reduzir a sua dimensão. Quando os juvenis forem suficientemente grandes para consumir os granulados inteiros, deixa de ser necessário triturá-los ou esmagá-los. Os animais devem ser alimentados uma vez por dia. A alimentação dos juvenis deve permitir o crescimento e o desenvolvimento adequados dos organismos: recomenda-se um peso médio de 11,5 ± 3 g nos juvenis de controlo no final do ensaio.

Química analítica

35. Antes do início do ensaio, há que definir a estabilidade do produto químico em estudo (*por exemplo*, a solubilidade, a degradabilidade e a volatilidade) e todos os métodos analíticos necessários, *por exemplo* com base em informações ou conhecimentos existentes. Em caso de administração das doses através da água de diluição, recomenda-se a análise das soluções de cada cuba replicada antes do início do ensaio, para verificar o desempenho do sistema. Durante o período de exposição, determinam-se as concentrações do produto químico em estudo a intervalos adequados, de preferência uma vez por semana em, pelo menos, um replicado para cada grupo de tratamento, mudando todas as semanas de replicado num mesmo grupo de tratamento. Recomenda-se que os resultados se baseiem em concentrações medidas. Todavia, se a concentração do produto químico testado em solução tiver sido corretamente mantida, durante todo o ensaio, num intervalo de ± 20 % em relação à concentração nominal, os resultados podem basear-se nos valores nominais ou nos valores medidos. Além disso, o coeficiente de variação (CV) das concentrações de ensaio medidas ao longo de todo o período de ensaio num tratamento deve ser mantido, no máximo, a 20 % em cada concentração. Se as concentrações medidas não permanecerem no intervalo de 80-120 % da concentração nominal (por exemplo, ao testar produtos químicos altamente biodegradáveis ou adsorventes), as concentrações com efeito devem ser determinadas e expressas em relação à média aritmética das concentrações dos ensaios de fluxo contínuo.

▼M8

36. Os débitos da água de diluição e da solução-mãe devem ser verificados a intervalos adequados – por exemplo, três vezes por semana – durante o período de exposição. No caso de produtos químicos que não possam ser detetados em algumas ou todas as concentrações nominais (por exemplo, devido a degradação rápida ou adsorção nas cubas de ensaio, ou a uma acumulação significativa no organismo dos animais expostos), recomenda-se que a taxa de renovação da solução de ensaio em cada cuba seja adaptada de modo a manter as concentrações de ensaio tão constantes quanto possível.

Observações e parâmetros medidos

37. Os parâmetros avaliados durante a exposição correspondem aos indicadores de toxicidade, incluindo mortalidade, comportamento anormal, sinais clínicos de doença e/ou de toxicidade geral e determinantes do crescimento (comprimento e peso), bem como aos parâmetros patológicos que possam corresponder, quer à toxicidade geral, quer aos mecanismos de ação dos perturbadores endócrinos que agem em processos fisiológicos mediados por estrogénios, por androgénios ou pela tiroide. Além disso, a concentração plasmática de VTG pode ser medida, a título facultativo, no final do ensaio. Esta medição pode ser útil para interpretar os resultados do estudo no contexto dos mecanismos endócrinos dos produtos químicos suspeitos de serem desreguladores endócrinos. Os parâmetros e o calendário das medições encontram-se resumidos no quadro 1.

Quadro 1

Síntese dos parâmetros do LAGDA

Parâmetros (*)	Diariamente	Amostragem intercalar (amostras larvares)	Fim do ensaio (amostras de juvenis)
Mortalidade e anomalias	X		
Tempo até à fase NF62		X	
Histo(pato)logia (glândula tiroide)		X	
Morfometria (aumento do peso e do comprimento)		X	X
Índice hepatossomático (IHS)			X
Rácios sexuais genéticos/fenotípicos			X
Histopatologia (gónadas, ductos reprodutores, rins e fígado)			X
Vitelogenina (VTG) (facultativo)			X

(*) Todos os parâmetros são analisados em termos estatísticos.

Mortalidade e observações diárias

38. Todos os viveiros devem ser verificados diariamente para detetar animais mortos, devendo registar-se a mortalidade em cada viveiro. Os animais mortos devem ser retirados do viveiro logo que sejam detetados. Deve registar-se do seguinte modo a fase de desenvolvimento dos animais mortos: anterior à

▼M8

fase NF58 (antes da aparição dos membros anteriores), entre as fases NF58 e NF62, entre as fases NF63 e NF66 (entre a fase NF62 e a absorção total da cauda) e posterior à fase NF66 (pós-larvar). Taxas de mortalidade superiores a 20 % podem indicar condições de ensaio inadequadas ou efeitos manifestamente tóxicos do produto químico em estudo. Os animais tendem a ser mais sensíveis a episódios de mortalidade não induzida por produtos químicos durante os primeiros dias de desenvolvimento após a desova e durante o clímax metamórfico. Esta mortalidade pode ser visível a partir dos dados de controlo.

39. Além disso, deve registar-se qualquer comportamento anormal observado, bem como malformações visíveis (por exemplo, escoliose) ou lesões. As observações de escoliose devem ser contadas (determinação da incidência) e classificadas quanto à gravidade (por exemplo, não observada – NO, mínima – 1, moderada – 2, grave – 3; apêndice 8). Devem envidar-se esforços para limitar a prevalência de escoliose moderada e grave (inferior a 10 % nos controlos) ao longo de todo o estudo, embora uma maior prevalência de anomalias no controlo não constitua necessariamente um motivo para interromper o ensaio. O comportamento normal dos animais em fase larvar caracteriza-se pela suspensão na coluna de água com a cauda a um nível superior à cabeça, pelo batimento rítmico regular da barbatana caudal, por emersões periódicas, pelos movimentos dos opérculos e pela reação a estímulos. Constituem comportamentos anormais, por exemplo, a flutuação à superfície, a imobilização no fundo do viveiro, a natação invertida ou irregular, a falta de atividade à superfície e a ausência de reação aos estímulos. Para os animais pós-metamórficos, além dos comportamentos anormais acima referidos, devem registar-se diferenças notórias no consumo de alimentos entre os grupos tratados. Entre as lesões e malformações visíveis podem incluir-se anomalias morfológicas (por exemplo, deformações dos membros), lesões hemorrágicas, edema abdominal e infeções bacterianas ou fúngicas, entre outras. O surgimento de lesões na cabeça dos juvenis, logo atrás das narinas, pode indiciar níveis de humidade insuficientes. Estas determinações são de ordem qualitativa e são consideradas análogas aos sinais clínicos de doença/*stress*, sendo efetuadas em comparação com os animais de controlo. Uma taxa de ocorrência nos viveiros superior à dos controlos constitui prova de toxicidade manifesta.

Subamostras de larvas

Descrição geral da preparação de subamostras de larvas:

40. Os girinos que tenham atingido a fase NF62 devem ser retirados dos viveiros e colhidos para amostragem ou transferidos para um novo viveiro para a parte seguinte da exposição, ou separados fisicamente dos restantes girinos no mesmo viveiro com um divisor. Os girinos são verificados diariamente, registando-se os dias do estudo em que cada girino atinge a fase NF62. A característica determinante no âmbito desta avaliação é a forma da cabeça. No momento em que o tamanho da cabeça diminui ao ponto de parecer ter sensivelmente a mesma largura que o tronco do girino e em que os membros anteriores atingem o nível do meio do coração, o indivíduo é registado como tendo atingido a fase NF62.

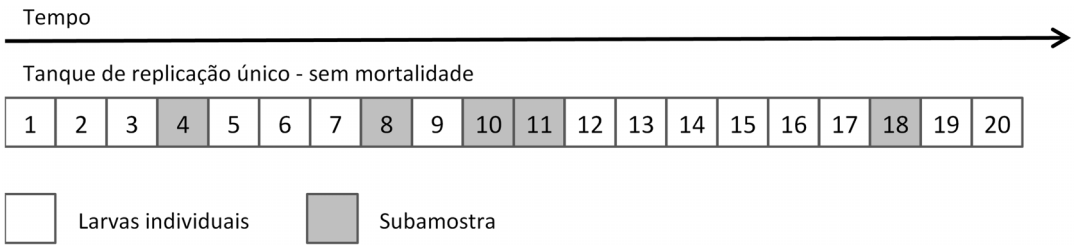
41. O objetivo é recolher amostras de um número total de cinco girinos na fase NF62 por cuba replicada. Este procedimento deve ser realizado de forma totalmente aleatória, mas decidida *a priori*. A **figura 1** apresenta um exemplo hipotético de uma cuba replicada. Caso existam 20 girinos sobreviventes num viveiro específico quando o primeiro indivíduo atinge a fase NF62, devem ser escolhidos ao acaso cinco números de 1 a 20. O girino n.º 1 é o primeiro indivíduo a atingir a fase NF62 e o girino n.º 20 é o último indivíduo do viveiro a atingir a fase NF62. Do mesmo modo, se houver 18 larvas sobreviventes num viveiro, devem ser escolhidos cinco números ao acaso de 1 a 18. Segue-se o mesmo procedimento para cada cuba replicada assim que o primeiro indivíduo do ensaio atinge a fase NF62. Caso sejam detetados animais mortos durante a fase NF62 da amostragem, as restantes amostras têm de ser novamente selecionadas aleatoriamente, com base no número de larvas remanescentes abaixo da fase NF62 e no número de amostras adicionais necessárias para atingir um total de cinco amostras a partir desse replicado. No dia em que um girino atinge a fase NF62, consulta-se o diagrama de amostragem elaborado para determinar se o indivíduo em causa deve ser colhido para amostragem ou separado fisicamente

▼**M8**

dos restantes girinos para continuar a ser exposto. No exemplo apresentado (figura 1), o primeiro indivíduo a atingir a fase NF62 (caixa n.º 1) é separado fisicamente das outras larvas, continua a ser exposto e regista-se o dia do estudo em que tenha atingido a fase NF62. Subsequentemente, os indivíduos n.º 2 e n.º 3 são tratados da mesma forma que o n.º 1; em seguida, o indivíduo n.º 4 é colhido para amostra, para observação do crescimento e histologia da tiroide (neste exemplo). Este procedimento continua até que o 20.º indivíduo se junte aos restantes indivíduos que passaram a fase NF62 ou seja incluído na amostra. O procedimento aleatório utilizado deve permitir que cada indivíduo tenha a mesma probabilidade de ser selecionado. Para isso, é válido qualquer método de escolha aleatória, embora seja necessário garantir que todos os girinos são contabilizados a um dado momento durante o período de subamostragem, antes de alcançarem a fase NF62.

Figura 1

Exemplo hipotético do regime de amostragem na fase NF62 para uma única cuba replicada



42. No caso da subamostragem das larvas, os parâmetros obtidos são os seguintes: 1) tempo decorrido até à fase NF62 (número de dias entre a fecundação e a fase NF62); 2) anomalias externas; 3) morfometria (por exemplo, peso e comprimento); 4) histologia da tiroide.

Eutanásia dos girinos

43. A subamostra de girinos na fase NF62 (cinco indivíduos por replicado) deve ser eutanasiada por imersão, durante 30 minutos, em quantidades adequadas (por exemplo, 500 ml) de solução anestésica (por exemplo, solução a 0,3 % de MS-222, metanossulfonato de tricaína, n.º CAS 886-86-2). A solução de MS-222 deve ser tamponada com bicarbonato de sódio até atingir um pH de cerca de 7,0, uma vez que uma solução MS-222 não tamponada é ácida e irritante para a pele da rã, resultando numa absorção deficiente e em tensão adicional desnecessária para os animais.

44. Os girinos são retirados da cuba experimental utilizando um enxalavar e transportados para a solução de eutanásia, onde são colocados. O animal é devidamente eutanasiado, estando preparado para a autópsia quando deixa de responder a estímulos externos como o beliscar do membro posterior com um par de fórceps.

Morfometria (peso e comprimento)

45. As medições do peso húmido (arredondada para o mg mais próximo) e do comprimento do focinho à cloaca (CFC) (arredondada para o 0,1 mm mais próximo) de cada girino devem ser efetuadas imediatamente depois de deixar de responder aos estímulos sob o efeito da anestesia (figura 2a). Pode

▼M8

utilizar-se *software* de análise de imagem para medir o CFC a partir de uma fotografia. Os girinos devem ser secados por tamponagem antes de serem pesados, de modo a remover o excesso de água aderente. Após as medições da dimensão corporal (peso e CFC), devem registar-se ou anotar-se quaisquer anomalias morfológicas visíveis e/ou sinais clínicos de toxicidade, tais como escoliose (ver apêndice 8), petéquias e hemorragia, sendo recomendável a utilização de documentação digital. De notar que as petéquias são pequenas hemorragias de cor vermelha ou púrpura nos capilares subcutâneos.

Colheita e fixação de tecidos

46. As glândulas tiroides da subamostra de larvas são submetidas a uma avaliação histológica. A parte inferior do tronco posterior aos membros anteriores é removida e rejeitada. A carcaça cortada é fixada em fixador de Davidson. O volume de fixador no recipiente deve ser, no mínimo, 10 vezes o volume aproximado dos tecidos. O fixador deve ser agitado ou circulado de forma adequada, para fixar corretamente os tecidos a analisar. Todos os tecidos permanecem no fixador de Davidson durante, pelo menos, 48 horas, mas não mais de 96 horas, altura em que são enxaguados com água desionizada e armazenados em formol neutro tamponado a 10 % (1) (29).

Histologia da tiroide

47. Cada subamostra de larvas (tecidos fixados) é submetida a uma avaliação histológica da glândula tiroide, nomeadamente diagnóstico e classificação da gravidade (29) (30).

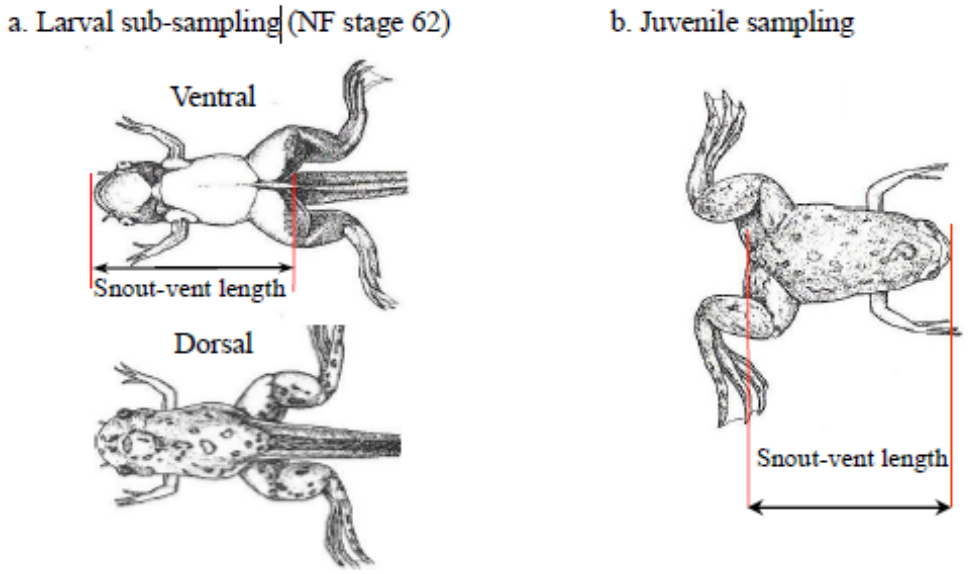


Figura 2: Referências para a medição do comprimento do focinho à cloaca para o LAGDA nas rãs em fase NF62 (a) e juvenis (b). Características que definem a fase NF62 (a): a cabeça tem a mesma largura que o tronco, o comprimento do nervo olfativo é inferior ao diâmetro do bulbo olfativo (vista dorsal) e os membros anteriores estão ao nível do coração (vista ventral). Imagens adaptadas de Nieuwkoop e Faber (1994).

Fim da exposição larvar

48. Tendo em conta o número inicial de girinos, é provável que uma pequena percentagem de indivíduos não se desenvolva normalmente e não complete a metamorfose (fase NF66) num período razoável. A parte larvar da exposição

▼M8

não deve exceder 70 dias. Os girinos restantes no final deste período devem ser eutanasiados (ver ponto 43), o seu peso húmido e CFC medidos, a sua fase de desenvolvimento determinada segundo Nieuwkoop e Faber (1994) e quaisquer anomalias de desenvolvimento anotadas.

Seleção após a fase NF66

49. Devem permanecer dez indivíduos por viveiro a partir da fase NF66 (reabsorção completa da cauda), até ao final da exposição. Por conseguinte, há que efetuar uma seleção após todos os animais terem atingido a fase NF66 ou após 70 dias (consoante o que ocorrer primeiro). Os animais que tenham atingido a fase NF66 mas que não serão expostos até ao final da exposição devem ser selecionados aleatoriamente.

50. Os animais não selecionados para serem conservados até ao fim da exposição são eutanasiados (ver ponto 43). Determina-se a fase de desenvolvimento, o peso húmido e o CFC (figura 2b) e é efetuada uma autópsia macroscópica de cada animal. Regista-se o sexo fenotípico (com base na morfologia das gónadas) – feminino, masculino ou indeterminado.

Amostras de juvenis

Descrição geral da preparação de amostras de juvenis

51. Os restantes animais continuam a ser expostos até 10 semanas após o tempo médio que decorre até à fase NF62 no controlo com água de diluição (e/ou no controlo com solvente, se for caso disso). No final do período de exposição, os restantes animais (no máximo, 10 rãs por replicado) são eutanasiados e os vários parâmetros medidos, ou avaliados, e registados: 1) morfometria (peso e comprimento); 2) rácios sexuais fenotípicos/genotípicos; 3) peso hepático (índice hepatossomático); 4) histopatologia (gónadas, ductos reprodutores, fígado e rins); a título facultativo, 5) VTG plasmática.

Eutanásia das rãs

52. As amostras de juvenis (rãs pós-metamórficas) são eutanasiadas por injeção intraperitoneal de um anestésico, como, por exemplo, MS-222 a 10 % numa solução-tampão de fosfatos adequada. As rãs podem ser incluídas na amostra depois de deixarem de responder a estímulos (em geral cerca de 2 minutos após a injeção, se for utilizado MS-222 a 10 % numa dosagem de 0,01 ml por g de rã). Embora as rãs juvenis possam ser imersas num anestésico mais concentrado (MS-222), a experiência demonstrou que uma anestesia segundo este método é mais demorada e que esta duração poderá não ser adequada para a amostragem. A injeção permite uma eutanásia rápida e eficiente antes da amostragem. A amostragem não deve ser iniciada antes de se confirmar a ausência de resposta das rãs a estímulos, para garantir que os animais estão mortos. Se as rãs apresentarem sinais de sofrimento considerável (muito graves, com morte previsível) e se considerar estarem moribundas, devem ser anestesiadas e eutanasiadas, sendo incluídas no parâmetro «mortalidade» para efeitos de análise de dados. Quando uma rã é eutanasiada devido a morbilidade, este facto deve ser registado e notificado. Consoante o momento do estudo em que a rã é eutanasiada, pode ser conservada e fixada para análise histopatológica.

Morfometria (peso e comprimento)

53. As medições do peso húmido e do CFC (figura 2b) são idênticas às descritas para as subamostras de larvas.

▼M8

VTG plasmática (opção)

54. A VTG é um biomarcador amplamente aceite, resultante da exposição a produtos químicos estrogénicos. No que respeita ao LAGDA, a VTG plasmática pode, a título facultativo, ser medida em amostras de juvenis, o que pode ser particularmente útil se se suspeitar que o produto químico em estudo é um estrogénio.

55. Os membros posteriores dos juvenis eutanasiados são cortados e o sangue recolhido com um tubo capilar heparinizado (embora possam revelar-se adequados métodos alternativos de colheita de sangue, como a punção cardíaca). O sangue é expelido para um tubo de microcentrífuga (por exemplo, de 1,5 ml) e centrifugado para obter plasma. As amostras de plasma devem ser armazenadas a uma temperatura igual ou inferior a -70 °C até à determinação da VTG. A concentração de VTG plasmática pode ser determinada por um ensaio de imunoabsorção enzimática (método ELISA – apêndice 6) ou por um método alternativo, como a espectrometria de massa (31). É preferível utilizar anticorpos específicos da espécie, devido à sua maior sensibilidade.

Determinação do sexo genético

56. O sexo genético de cada rã juvenil é avaliado com base nos marcadores desenvolvidos por Yoshimoto *et al.* (11). Para determinar o sexo genético, uma parte (ou a totalidade) de um membro posterior – ou de qualquer outro tecido – removido durante a dissecação é recolhida e armazenada num tubo de microcentrífuga; podem obter-se amostras de tecido de rãs a partir de qualquer tecido. Os tecidos podem ser armazenados a uma temperatura igual ou inferior a -20 °C até ao isolamento do ácido desoxirribonucleico (ADN). O isolamento do ADN a partir dos tecidos pode ser efetuado com *kits* disponíveis no mercado e a análise da presença ou ausência do marcador é efetuada por um método de reação em cadeia da polimerase (PCR) (apêndice 5). Regra geral, a concordância entre o sexo histológico e o genótipo dos animais de controlo no momento da amostragem dos juvenis nos grupos de controlo é superior a 95 %.

Colheita e fixação de tecidos para histopatologia

57. As gónadas, os ductos reprodutores, os rins e os fígados são colhidos para análise histológica durante a amostragem final. A cavidade abdominal é aberta e o fígado é dissecado e pesado. Em seguida, os órgãos digestivos (estômago, intestinos, etc.) são cuidadosamente retirados do abdómen inferior para revelar as gónadas, os rins e os ductos reprodutores. Devem anotar-se quaisquer anomalias morfológicas visíveis nas gónadas. Por último, os membros posteriores devem ser removidos se não tiverem sido previamente retirados para colheita de sangue. Os fígados colhidos e a carcaça com as gónadas deixadas *in situ* devem ser imediatamente colocados em fixador de Davidson. O volume de fixador no recipiente deve ser, no mínimo, 10 vezes o volume aproximado dos tecidos. Todos os tecidos permanecem no fixador de Davidson durante, pelo menos, 48 horas, mas não mais de 96 horas, altura em que são enxaguados com água desionizada e armazenados em formol neutro tamponado a 10 % (1) (29).

Histopatologia

58. Cada amostra de juvenis é submetida a uma análise histológica para detetar uma eventual patologia nas gónadas, nos ductos reprodutores, nos rins e nos tecidos hepáticos, para diagnóstico e classificação de gravidade (32). O fenótipo gonadal (ovários, testículos, intersexual) decorre também desta avaliação. Juntamente com as medições do sexo genético de cada indivíduo, estas observações podem ser utilizadas para calcular os rácios sexuais fenotípicos/genotípicos.

▼M8

DADOS E RELATÓRIO

Análise estatística

59. O LAGDA gera três tipos de dados a analisar estatisticamente: 1) dados quantitativos contínuos (peso, CFC, IHS, VTG); 2) dados relativos ao tempo até ao evento, no que se refere às taxas de desenvolvimento (número de dias desde o início do ensaio até à fase NF62); 3) dados ordinais sob a forma de índices de gravidade ou fases de desenvolvimento a partir de avaliações histopatológicas.

60. Recomenda-se que a conceção do ensaio e a seleção dos testes estatísticos assegurem a representatividade necessária para detetar alterações de importância biológica nos parâmetros, sempre que se deva comunicar uma NOEC ou CEx. É preferível efetuar estas análises estatísticas (em geral, com base na média dos replicados) segundo os procedimentos descritos no documento da OCDE sobre os métodos atuais de análise estatística dos dados de ecotoxicidade (*Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application*) (33). O apêndice 7 apresenta a árvore de decisão recomendada para a análise estatística e fornece orientações para o tratamento dos dados e para a escolha do teste, ou modelo estatístico, mais adequado a utilizar no LAGDA.

61. Os dados das amostras de juvenis (crescimento, IHS, etc.) devem ser analisados separadamente para cada sexo genotípico, uma vez que este é determinado para todas as rãs.

Considerações relativas à análise dos dados

Utilização de replicados e de tratamentos comprometidos

62. Os replicados e os tratamentos podem ser comprometidos devido a uma mortalidade excessiva resultante de toxicidade manifesta, doença ou erro técnico. Se um tratamento for comprometido devido a doença ou erro técnico, devem estar disponíveis para análise três tratamentos não comprometidos e três replicados não comprometidos. Se ocorrer toxicidade manifesta no(s) tratamento(s) com doses elevadas, é preferível que estejam disponíveis para análise, pelo menos, três níveis de tratamento com três replicados não comprometidos – de acordo com a abordagem da concentração máxima tolerada nas orientações de ensaio da OCDE (34). Além da mortalidade, os sinais de toxicidade manifesta podem incluir efeitos comportamentais (por exemplo, flutuação à superfície, imobilização no fundo do viveiro, natação invertida ou irregular, falta de atividade à superfície), lesões morfológicas (por exemplo, lesões hemorrágicas, edema abdominal) ou inibição de reações normais ao regime alimentar quando em comparação com os animais de controlo, de um ponto de vista qualitativo.

Controlo com solvente

63. No final do ensaio, deve efetuar-se uma avaliação dos efeitos potenciais do solvente (se tiver sido utilizado). Para isso, efetua-se uma comparação estatística dos resultados do grupo de controlo com solvente com os do grupo de controlo com água de diluição. Os parâmetros mais relevantes a considerar nesta análise são os fatores que determinam o crescimento (peso e comprimento), já que podem ser afetados em caso de toxicidade generalizada. Se forem detetadas diferenças estatisticamente significativas nestes parâmetros entre o grupo de controlo com água de diluição e o grupo de controlo com solvente, deve recorrer-se ao parecer de um perito para determinar se a validade do ensaio foi comprometida. Se os dois controlos diferirem, os grupos expostos ao produto químico devem ser comparados com o controlo com solvente, a menos que se saiba que é preferível compará-los com o controlo com água de diluição. Caso não haja diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos de controlo, recomenda-se que os grupos expostos ao produto químico em estudo sejam comparados com os dois grupos de controlo em conjunto (controlo com solvente e controlo com água de diluição), exceto se se souber que é preferível compará-los, quer com o grupo de controlo com água de diluição, quer com o grupo de controlo com solvente.

▼M8

Relatório de ensaio

64. O relatório de ensaio deve incluir os seguintes elementos:

Produto químico em estudo:

— Natureza física e propriedades físico-químicas pertinentes;

— Substância monocomponente:

aspeto físico, solubilidade na água e outras propriedades físico-químicas pertinentes;

identificação química, como o nome IUPAC ou CAS, o número CAS, o código SMILES ou InChI, a fórmula estrutural, a pureza, a identidade química das impurezas, se necessário e exequível, etc. (incluindo o teor de carbono orgânico, se for caso disso).

— Substância multicomponentes, UVCB e misturas:

caracterizada, na medida do possível, pela identidade química (ver acima), pela ocorrência quantitativa e pelas principais propriedades físico-químicas dos componentes.

Espécie utilizada no ensaio:

— Nome científico, estirpe, se disponível, origem e método de colheita dos ovos fecundados e posterior manuseamento;

— Incidência de escoliose em controlos históricos no que diz respeito à cultura-mãe utilizada.

Condições de ensaio:

— Fotoperíodo(s);

— Conceção do ensaio (por exemplo, dimensões da câmara, volume de água e material, número de câmaras de ensaio e replicados, número de organismos de ensaio por replicado);

— Método de preparação das soluções-mãe e frequência da renovação (se for utilizado um agente solubilizante, deve indicar-se a sua concentração);

— Método de dosagem do produto químico em estudo (por exemplo, bombas, sistemas de diluição);

— Eficiência de recuperação do método e valores nominais das concentrações de ensaio, limite de quantificação, médias dos valores medidos nas cubas de ensaio e respetivos desvios-padrão; método de obtenção desses desvios e médias, bem como elementos comprovativos de que as medições correspondem às concentrações do produto químico em estudo perfeitamente dissolvido;

— Características da água de diluição: pH, dureza, temperatura, concentração de oxigénio dissolvido, níveis de cloro residual (caso tenham sido medidos), iodo total, carbono orgânico total (idem), sólidos em suspensão (idem), salinidade do meio de ensaio (idem) e quaisquer outras medições efetuadas;

— Valores nominais das concentrações de ensaio, médias dos valores medidos e respetivos desvios-padrão;

— Qualidade da água nos recipientes de ensaio, pH, temperatura (diariamente) e concentração de oxigénio dissolvido;

▼M8

— Informações pormenorizadas sobre a alimentação (por exemplo, tipo de alimentos, origem, quantidade distribuída e frequência).

Resultados:

— Provas de que os controlos cumpriram os critérios de validade;

— Dados relativos ao grupo de controlo (mais o controlo com solvente, se este tiver sido utilizado) e aos grupos tratados: mortalidade e anomalias observadas, tempo decorrido até à fase NF62, avaliação da histologia da tiroide (apenas amostra de larvas), crescimento (peso e comprimento), IHS (apenas amostra de juvenis), rácios sexuais genéticos/fenotípicos (apenas amostra de juvenis), resultados da avaliação histopatológica das gónadas, ductos reprodutores, rins e fígado (apenas amostra de juvenis) e VTG plasmática (apenas amostra de juvenis, se efetuada);

— Abordagem para a análise estatística e tratamento de dados (teste ou modelo estatístico utilizado);

— Concentração sem efeitos observáveis (NOEC) para cada resposta avaliada;

— Concentração mínima com efeito observável (LOEC) para cada resposta avaliada (a α=0,05); CEx para cada resposta avaliada, se aplicável, e intervalos de confiança (95 %, por exemplo); gráfico do modelo ajustado utilizado para a calcular a CEx, declive da curva concentração-resposta, fórmula do modelo de regressão e estimativa dos parâmetros do modelo e dos respetivos erros-padrão.

— Qualquer desvio em relação ao presente método de ensaio e aos critérios de aceitação, bem como considerações relativas ao eventual seguimento a dar aos resultados do ensaio.

65. No que diz respeito aos resultados das medições dos parâmetros, devem apresentar-se os valores médios e os respetivos desvios-padrão (por replicado e por concentração, se possível).

66. Deve calcular-se o tempo médio decorrido até à fase NF62 nos controlos, apresentado como a média das medianas nos replicados e o seu desvio-padrão. Do mesmo modo, para os tratamentos, deve calcular-se uma mediana, apresentada como a média das medianas nos replicados e o seu desvio-padrão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(1) U.S. Environmental Protection Agency (2013). Validation of the Larval Amphibian Growth and Development Assay: Integrated Summary Report.

(2) OECD (2012a). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disrupters. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 150) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(3) Nieuwkoop PD and Faber J. (1994). Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin). Garland Publishing, Inc, Nova Iorque, NY, EUA.

(4) Kloas W and Lutz I. (2006). Amphibians as Model to Study Endocrine Disrupters. Journal of Chromatography A 1130: 16-27.

▼**M8**

(5) Chang C, Witschi E. (1956). Genic Control and Hormonal Reversal of Sex Differentiation in *Xenopus*. Journal of the Royal Society of Medicine 93: 140-144.

(6) Gallien L. (1953). Total Inversion of Sex in *Xenopus laevis* Daud, Following Treatment with Estradiol Benzoate Administered During Larval Stage. Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences 237: 1565.

(7) Villalpando I and Merchant-Larios H. (1990). Determination of the Sensitive Stages for Gonadal Sex-Reversal in *Xenopus Laevis* Tadpoles. International Journal of Developmental Biology 34: 281-285.

(8) Miyata S, Koike S and Kubo T. (1999). Hormonal Reversal and the Genetic Control of Sex Differentiation in *Xenopus*. Zoological Science 16: 335-340.

(9) Mikamo K and Witschi E. (1963). Functional Sex-Reversal in Genetic Females of *Xenopus laevis*, Induced by Implanted Testes. Genetics 48: 1411.

(10) Olmstead AW, Kosian PA, Korte JJ, Holcombe GW, Woodis K and Degitz SJ. (2009)a. Sex reversal of the Amphibian, *Xenopus tropicalis*, Following Larval Exposure to an Aromatase Inhibitor. Aquatic Toxicology 91: 143-150.

(11) Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Takamatsu N, Shiba T and Ito M. (2008). A W-linked DM-Domain Gene, DM-W, Participates in Primary Ovary Development in *Xenopus Laevis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105: 2469-2474.

(12) Olmstead AW, Korte JJ, Woodis KK, Bennett BA, Ostazeski S and Degitz SJ. (2009)b. Reproductive Maturation of the Tropical Clawed Frog: *Xenopus tropicalis*. General and Comparative Endocrinology 160: 117-123.

(13) Tobias ML, Tomasson J and Kelley DB. (1998). Attaining and Maintaining Strong Vocal Synapses in Female *Xenopus laevis*. Journal of Neurobiology 37: 441-448.

(14) Qin ZF, Qin XF, Yang L, Li HT, Zhao XR and Xu XB. (2007). Feminizing/Demasculinizing Effects of Polychlorinated Biphenyls on the Secondary Sexual Development of *Xenopus Laevis*. Aquatic Toxicology 84: 321-327.

(15) Porter KL, Olmstead AW, Kumsher DM, Dennis WE, Sprando RL, Holcombe GW, Korte JJ, Lindberg-Livingston A and Degitz SJ. (2011). Effects of 4-*Tert*-Octylphenol on *Xenopus Tropicalis* in a Long Term Exposure. Aquatic Toxicology 103: 159-169.

(16) ASTM. (2002). Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. ASTM E729-96, Filadélfia, PA, EUA.

(17) Capítulo C.4 do presente anexo: Ensaio de biodegradabilidade fácil.

(18) Capítulo C.29 do presente anexo: Biodegradabilidade fácil — CO2 em recipientes estanques (ensaio pela técnica de «headspace»).

(19) Kahl MD, Russom CL, DeFoe DL and Hammermeister DE (1999). Saturation Units for Use in Aquatic Bioassays. Chemosphere 39: 539--551.

▼**M8**

(20) Adolfsson-Erici M, Åkerman G, Jahnke A, Mayer P, McLachlan MS (2012). A flow-through passive dosing system for continuously supplying aqueous solutions of hydrophobic chemicals to bioconcentration and aquatic toxicity tests. Chemosphere, 86(6): 593-9.

(21) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 23), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(22) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ and Pickford DB. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. Review. Aquatic Toxicology 76: 69–92.

(23) ASTM (2004). Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay - *Xenopus* (FETAX). ASTM E1439 - 98, Filadélfia, PA, EUA.

(24) Read BT (2005). Guidance on the Housing and Care of the African Clawed Frog *Xenopus Laevis*. Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals (RSPCA), Horsham, Sussex, U.K., 84 pp.

(25) Capítulo C.38 do presente anexo, Ensaio da Metamorfose dos Anfíbios.

(26) Capítulo C.48 do presente anexo, Ensaio de reprodução a curto prazo em peixes.

(27) Capítulo C.41 do presente anexo, Ensaio de desenvolvimento sexual em peixes.

(28) Capítulo C.49 do presente anexo, Ensaio de toxicidade aguda em embriões de peixe (FET).

(29) OECD (2007). Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology.Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. (No 82) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(30) Grim KC, Wolfe M, Braunbeck T, Iguchi T, Ohta Y, Tooi O, Touart L, Wolf DC and Tietge J. (2009). Thyroid Histopathology Assessments for the Amphibian Metamorphosis Assay to Detect Thyroid-Active Substances, Toxicological Pathology 37: 415-424.

(31) Luna LG and Coady K.(2014). Identification of *X. laevis* Vitellogenin Peptide Biomarkers for Quantification by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. Analytical and Bioanalytical Techniques 5(3): 194.

(32) OECD (2015). Guidance on histopathology techniques and evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 228), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(33) OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 54), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(34) Hutchinson TH, Bögi C, Winter MJ, Owens JW, 2009. Benefits of the Maximum Tolerated Dose (MTD) and Maximum Tolerated concentration (MTC) Concept in Aquatic Toxicology. Aquatic Toxicology 91(3): 197-202.

▼M8

Apêndice 1

DEFINIÇÕES

CEx: (Concentração efetiva com x % de efeito) concentração que causa efeitos em x % dos organismos sujeitos a ensaio num determinado período de exposição, comparativamente a um grupo de controlo. Por exemplo, a CE50 é a concentração estimada que produz efeitos num parâmetro do ensaio em 50 % de uma população exposta durante um determinado período de exposição.

Concentração mínima com efeito observável (LOEC): A menor concentração de ensaio de um produto químico em estudo para a qual se observa um efeito significativo (a $p < 0,05$), comparativamente com o controlo. No entanto, todas as concentrações de ensaio superiores à LOEC devem ter um efeito prejudicial igual ou superior aos observados com a LOEC. Quando estas duas condições não puderem ser satisfeitas, deverá ser fornecida uma explicação pormenorizada sobre a forma como se determinou a LOEC (e, consequentemente, a NOEC). O apêndice 7 fornece orientações nesta matéria.

Concentração letal média (CL50): Concentração de um produto químico em estudo que se estima ser letal para 50 % dos organismos sujeitos ao ensaio durante o ensaio.

Concentração sem efeito observável (NOEC): Concentração de ensaio imediatamente abaixo da LOEC que, comparativamente ao grupo de controlo, não tem qualquer efeito estatisticamente significativo ($p < 0,05$), durante um determinado período de exposição.

dpf: Dias pós-fecundação.

Eixo HHG: Eixo hipotálamo-hipófise-gonadal.

ELISA: Ensaio de imunoabsorção enzimática.

Ensaio de fluxo contínuo: Um ensaio com fluxo contínuo de soluções de ensaio através do sistema de ensaio durante o período de exposição.

IUPAC: União Internacional de Química Pura e Aplicada.

Parâmetro apical: Provoca efeitos ao nível da população.

Produto químico: Substância ou mistura.

Produto químico em estudo: Qualquer substância ou mistura à qual seja aplicado o presente método de ensaio.

SMILES: Simplified Molecular Input Line Entry Specification.

UVCB: Substâncias de composição desconhecida ou variável, produtos de reação complexos ou materiais biológicos.

VTG: Vitelogenina. É uma fosfolipoglicoproteína precursora das proteínas do vitelo, que ocorre normalmente nas fêmeas sexualmente ativas de todas as espécies ovíparas.

▼**M8**

Apêndice 2

ALGUMAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DE UMA ÁGUA DE DILUIÇÃO ACEITÁVEL

Substância	Concentração limite
Partículas	5 mg/l
Carbono orgânico total	2 mg/l
Amoníaco não ionizado	1 µg/l
Cloro residual	10 µg/l
Pesticidas organofosforados totais	50 ng/l
Soma dos pesticidas organoclorados totais e dos bifenilos policlorados	50 ng/l
Cloro orgânico total	25 ng/l
Alumínio	1 µg/l
Arsénico	1 µg/l
Crómio	1 µg/l
Cobalto	1 µg/l
Cobre	1 µg/l
Ferro	1 µg/l
Chumbo	1 µg/l
Níquel	1 µg/l
Zinco	1 µg/l
Cádmio	100 ng/l
Mercúrio	100 ng/l
Prata	100 ng/l

▼**M8**

Apêndice 3

CONDIÇÕES DE ENSAIO PARA O LAGDA

1. Espécie de ensaio	*Xenopus laevis*
2. Tipo de ensaio	Fluxo contínuo
3. Temperatura da água	A temperatura nominal é de 21 °C. A temperatura média durante o ensaio é de 21 ± 1 °C (os diferenciais entre replicados e entre tratamentos não devem exceder 1 °C).
4. Qualidade da iluminação	Lâmpadas fluorescentes (largo espetro) 600--2000 lux (lúmenes/m^2) à superfície da água
5. Fotoperíodo	12 h de luz/12 h de escuridão
6. Volume da solução de ensaio e recipiente de ensaio (cuba)	4-10 l (profundidade mínima da água de 10–15 cm) Cuba de vidro ou de aço inoxidável
7. Renovação da solução de ensaio, em volume	Constante, a fim de garantir a estabilidade das condições biológicas e da exposição química (por exemplo, cinco renovações do volume do viveiro por dia)
8. Idade dos organismos de ensaio no início	Fase 8-10 segundo Nieuwkoop e Faber (NF)
9. Número de organismos por replicado	20 animais (embriões)/cuba (replicado) no início da exposição e 10 animais (juvenis)/cuba (replicado) após a fase NF66 e até ao fim da exposição
10. Número de tratamentos	No mínimo, 4 tratamentos com o produto químico em estudo e controlo(s) adequado(s).
11. Número de replicados por tratamento	4 replicados por tratamento com o produto químico em estudo e 8 replicados para o(s) controlo(s)
12. Número de organismos por concentração de ensaio	No mínimo 80 animais por tratamento com o produto químico em estudo e, no mínimo, 160 animais para o(s) controlo(s)
13. Água de diluição	Qualquer água que permita o crescimento e desenvolvimento normais de *X. laevis* (por exemplo, água de nascente ou água da torneira filtrada com carvão)
14. Arejamento	Não é necessária, mas o arejamento das cubas pode ser necessário se os níveis de oxigénio dissolvido descerem abaixo dos limites recomendados e se o fluxo da solução de ensaio for maximizado.
15. Oxigénio dissolvido da solução de ensaio	≥ 40 % do valor da saturação no ar ou ≥ 3,5 mg/l

▼**M8**

16. pH da solução de ensaio	6,5-8,5 (os diferenciais entre replicados e entre tratamentos não devem exceder 0,5)
17. Dureza e alcalinidade da solução de ensaio	10-250 mg $CaCO_3$/l
18. Regime alimentar	(Ver apêndice 4)
19. Período de exposição	Da fase NF8-10 a dez semanas após o tempo mediado até à fase NF62 no grupo de controlo com água de diluição e/ou solvente (máximo 17 semanas)
20. Parâmetros biológicos	Mortalidade (e anomalias observadas), tempo até à fase NF62 (amostra de larvas), avaliação da histologia da tiroide (amostra de larvas), crescimento (peso e comprimento), índice hepatossomático (amostra de juvenis), rácios sexuais genéticos/fenotípicos (amostra de juvenis), histopatologia das gónadas, ductos reprodutores, rins e fígado (amostra de juvenis) e vitelogenina plasmática (amostra de juvenis, facultativa).
21. Critérios de validade do ensaio	O oxigénio dissolvido deve ser > 40 % do valor da saturação no ar; A temperatura média da água deve ser de 21 ± 1 °C e os diferenciais entre replicados e entre tratamentos devem ser < 1,0 °C; O pH da solução de ensaio deve variar entre 6,5 e 8,5; A mortalidade no controlo deve ser ≤ 20 % em cada replicado e o tempo médio até à fase NF62 no controlo deve ser ≤ 45 dias; o peso médio dos organismos de ensaio na fase NF62 e no fim do ensaio no âmbito dos controlos e dos controlos com solvente (se utilizado) deve atingir, respetivamente, 1,0 ± 0,2 e 11,5 ± 3 g; os dados disponíveis devem demonstrar que as concentrações do produto químico em estudo em solução foram corretamente mantidas num intervalo de ± 20 % em relação à média dos valores medidos.

▼**M8**

Apêndice 4

REGIME ALIMENTAR

Note-se que, embora este regime alimentar seja recomendado, são admissíveis alternativas, desde que os organismos de ensaio cresçam e se desenvolvam a um ritmo adequado.

Alimentação das larvas

Preparação dos alimentos a administrar às larvas

A. 1:1 (v/v) alimento inicial para trutas: algas/TetraFin® (ou equivalente);

1. Alimento inicial para trutas: misturar 50 g de alimento inicial para trutas (grânulos finos ou pó) e 300 ml de água filtrada adequada num misturador a alta velocidade, durante 20 segundos

2. Mistura de algas/TetraFin® (ou equivalente): misturar 12 g de discos de espirulina com 500 ml de água filtrada num misturador a alta velocidade durante 40 segundos, misturar 12 g de Tetrafin® (ou equivalente) com 500 ml de água filtrada e, em seguida, combinar tudo a fim de obter 1 l de 12 g/l de espirulina e 12 g/l de Tetrafin® (ou equivalente)

3. Combinar volumes iguais da mistura de alimento inicial para trutas e da mistura de algas/TetraFin® (ou equivalente)

B. Artémias

Fazer eclodir 15 ml de ovos de artémias em 1 l de água salgada (preparada acrescentando 20 ml de NaCl a 1 l de água desionizada). Após o arejamento durante 24 horas à temperatura ambiente, sob luz constante, colhem-se as artémias. O fim do arejamento permite que as artémias se depositem durante 30 minutos. Os quistos que flutuem à superfície do coletor são retirados e eliminados e as artémias filtradas de forma adequada e mergulhadas em 30 ml de água filtrada.

Protocolo alimentar

O quadro 1 ilustra o tipo e a quantidade de alimentos administrados às larvas durante toda a exposição. Os animais devem ser alimentados três vezes por dia, de segunda a sexta-feira, e uma vez por dia aos fins de semana.

Quadro 1

Regime alimentar das larvas de *X. laevis* em condições de fluxo contínuo

Tempo (*) (pós-fecundação)	Alimento inicial para trutas: algas/TetraFin® (ou equivalente)		Artémias	
	Semana (3 vezes por dia)	Fim de semana (uma vez por dia)	Semana (duas vezes por dia)	Fim de semana (uma vez por dia)
Dias 4-14 (semanas 0-1)	0,33 ml	1,2 ml	0,5 ml (do dia 8 ao 15) 1 ml (a partir do dia 16)	0,5 ml (do dia 8 ao 15) 1 ml (a partir do dia 16)
Semana 2	0,67 ml	2,4 ml		
Semana 3	1,3 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
Semana 4	1,5 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
Semana 5	1,6 ml	4,4 ml	1 ml	1 ml

▼M8

Tempo (*) (pós-fecundação)	Alimento inicial para trutas: algas/TetraFin® (ou equivalente)		Artémias	
	Semana (3 vezes por dia)	Fim de semana (uma vez por dia)	Semana (duas vezes por dia)	Fim de semana (uma vez por dia)
Semana 6	1,6 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
Semana 7	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
Semanas 8-10	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml

(*) O dia 0 é definido como o dia da injeção de hCG.

Transição alimentar da fase larvar para a fase juvenil

Assim que completam a metamorfose, as larvas transitam para a fórmula alimentar destinada aos juvenis, que a seguir se especifica. Durante a transição, o regime alimentar das larvas deve ser reduzido à medida que o regime alimentar dos juvenis aumenta. Tal pode ser feito reduzindo as rações administradas às larvas na proporção do aumento das administradas aos juvenis em cada grupo de cinco girinos que ultrapasse a fase NF62 e se aproxime da conclusão da metamorfose na fase NF66.

Alimentação dos juvenis

Regime alimentar dos juvenis

Uma vez concluída a metamorfose (fase 66), o regime alimentar passa para alimentos de primeira escolha para anfíbios de 3/32 polegadas em exclusivo (Xenopus Express™, FL, EUA), ou equivalente.

Preparação de grânulos esmagados para a transição da fase larvar para a fase juvenil

Os granulados são triturados brevemente num moinho de café ou numa misturadora, ou esmagados com almofariz e pilão a fim de reduzir a sua dimensão em aproximadamente 1/3. O processamento excessivo produz pó, sendo, por isso, desaconselhado.

Protocolo alimentar

O **quadro 2** ilustra o tipo e a quantidade de alimentos administrados aos juvenis e aos adultos. Os animais devem ser alimentados uma vez por dia. Note-se que, após a metamorfose, os animais continuam a receber uma porção de artémias até mais de 95 % dos animais completarem a metamorfose.

Os animais não devem ser alimentados no dia da conclusão do ensaio, para que a alimentação não interfira na pesagem.

Quadro 2

Regime alimentar de juvenis de *X. laevis* em condições de fluxo contínuo. Note-se que os animais não metamorfoseados, incluindo aqueles cuja metamorfose foi atrasada pelo tratamento com o produto químico, não podem comer grânulos não esmagados

Tempo (*) (semanas após a data mediana de metamorfose)	Grânulos esmagados (mg por jovem rã)	Grânulos (mg por jovem rã)
Aquando da metamorfose dos animais	25	0
Semanas 0-1	25	28

▼**M8**

Tempo (*) (semanas após a data mediana de metamorfose)	Grânulos esmagados (mg por jovem rã)	Grânulos (mg por jovem rã)
Semanas 2-3	0	110
Semanas 4-5	0	165
Semanas 6-9	0	220

(*) O primeiro dia da Semana 0 é a data mediana de metamorfose nos animais de controlo.

▼M8

Apêndice 5

DETERMINAÇÃO DO SEXO GENÉTICO (SEXAGEM GENÉTICA)

O método de sexagem genética de *Xenopus laevis* baseia-se em Yosshimoto *et al.* (2008). Podem obter-se os procedimentos de genotipagem detalhados consultando esta publicação. É possível utilizar métodos alternativos (por exemplo, PCR quantitativa de alto débito), se isso for considerado adequado.

Iniciadores de X. laevis

Marcador DM-W

Senso: 5'-CCACACCCAGCTCATGTAAAG-3'

Contra-senso: 5'-GGGCAGAGTCACATATACTG-3'

Controlo positivo

Senso: 5'-AACAGGAGCCCAATTCTGAG-3'

Contra-senso: 5'-AACTGCTTGACCTCTAATGC-3'

Purificação do ADN

Purificar o ADN extraído de tecidos musculares ou cutâneos utilizando o Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit (cat # 69 506) – ou um produto similar –, de acordo com as respetivas instruções. O ADN pode ser eluído das colunas de centrifugação utilizando menos tampão para obter amostras mais concentradas, se tal for considerado necessário para a PCR. De notar que o ADN é bastante estável; convém, pois, ter cuidado para evitar contaminações cruzadas que possam conduzir a erros na caracterização dos machos como fêmeas, ou vice-versa.

PCR

O **quadro 1** apresenta um exemplo de protocolo utilizando JumpStart™ *Taq* da Sigma.

Quadro 1

Exemplo de protocolo utilizando JumpStart™ *Taq* da Sigma

Mistura principal	1x (µl)	[Final]
Água isenta de nuclease	11	—
Tampão 10X	2,0	—
$MgCl_2$ (25 mM)	2,0	2,5 mM
dNTP's (10mM cada)	0,4	200 µM
Marcador para iniciador senso (8 µM)	0,8	0,3 µM
Marcador para iniciador contra-senso (8 µM)	0,8	0,3 µM
Controlo para iniciador senso (8 µM)	0,8	0,3 µM
Controlo para iniciador contra-senso (8 µM)	0,8	0,3 µM
JumpStart™ Taq	0,4	0,05 unidades/µl
Matriz de ADN	1,0	~200 pg/µl

Nota: Ao preparar a mistura principal, preparar uma quantidade superior à desejada para compensar eventuais perdas que possam ocorrer durante a pipetagem (exemplo: utilizar 25x para apenas 24 reações).

▼**M8**

Reação

Mistura principal	19,0 µl
Matriz	1,0 µl
Total	20,0 µl

Perfil do termociclador

Passo 1.	94 °C	(1 min)
Passo 2.	94 °C	(30 seg)
Passo 3.	60 °C	(30 seg)
Passo 4.	72 °C	(1 min)
Passo 5.	Ir para o passo 2	(35 ciclos)
Passo 6.	72 °C	(1 min)
Passo 7.	4 °C	(manter)

Os produtos PCR podem ser colocados imediatamente num gel ou conservados a 4 °C.

Eletroforese em gel de agarose (3 %) (protocolo de amostragem)

TAE 50X

Tris	24,2 g
Ácido acético glacial	5,71 ml
Na_2 (EDTA) $2H_2O$	3,72 g

Adicionar água até perfazer 100 ml

TAE 1X

H_2O	392 ml
TAE 50X	8 ml

3:1 Agarose

3 partes de agarose NuSieve™ GTG™

1 parte de agarose Fisher de baixa eletroendosmose (EEO)

Método

1. Preparar um gel a 3 % acrescentando 1,2 g de mistura de agarose a 43 ml de TAE 1X. Agitar para fragmentar os agregados.

2. Aquecer a mistura de agarose no microondas até estar completamente dissolvida (evitar que ferva até transbordar). Deixar arrefecer ligeiramente.

3. Adicionar 1,0 µl de brometo de etídio (10 mg/ml). Agitar o frasco. Note-se que o brometo de etídio é mutagénico, pelo que, para minimizar os riscos para a saúde dos trabalhadores, devem ser utilizados produtos químicos alternativos, na medida do possível do ponto de vista técnico ([1]).

4. Verter o gel para um molde, com um pente. Deixar arrefecer completamente.

([1]) Em conformidade com o artigo 4.º, n.º 1, da Diretiva 2004/37/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de abril de 2004, relativa à proteção dos trabalhadores contra riscos ligados à exposição a agentes cancerígenos ou mutagénicos durante o trabalho (sexta diretiva especial nos termos do n.º 1 do artigo 16.º da Diretiva 89/391/CEE do Conselho) (JO L 158 de 30.4.2004, p. 50).

▼**M8**

5. Adicionar o gel ao aparelho. Cobrir o gel com TAE 1X.

6. Adicionar 1 µl de 6x corante de dissociação a cada volume de 10 µl de produto PCR.

7. Transferir as amostras para os poços utilizando uma pipeta.

8. Efetuar a eletroforese a 160 volts constantes durante ~20 minutos.

   A **figura 1** apresenta uma imagem do gel de agarose com os padrões de bandas indicativos de um indivíduo macho e de um indivíduo fêmea.

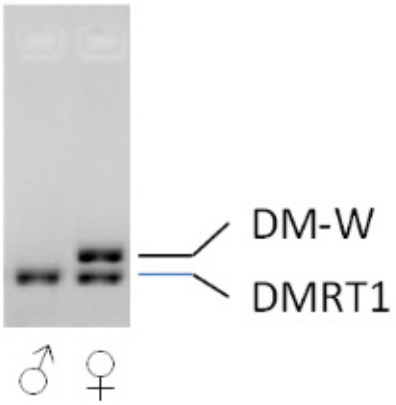


Figura 1 Imagem do gel de agarose com o padrão de banda indicativo de um macho (♂) (banda única a ~203 bp: DMRT1) e de uma fêmea (♀) (duas bandas a ~259 bp: DM-W e 203 bp:DMRT1).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Takamatsu N, Shiba T, Ito M. 2008. A W-linked DM-domain gene, DM-W, participates in primary ovary development in *Xenopus laevis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105: 2469-2474.

▼M8

Apêndice 6

DETERMINAÇÃO DA VITELOGENINA

A determinação da vitelogenina (VTG) efetua-se por recurso a um ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), originalmente desenvolvido para a VTG do vairão-de-cabeça-grande (Parks *et al.*, 1999). Atualmente, não existem anticorpos disponíveis no mercado para *X. laevis*. No entanto, dada a grande quantidade de informações relativas a esta proteína e a existência de serviços comerciais de produção de anticorpos com uma boa relação custo-eficácia, é razoável que os laboratórios possam facilmente desenvolver um teste ELISA para efetuar a determinação (Olmstead *et al.*, 2009). Além disso, estes autores apresentam uma descrição do ensaio modificado para a VTG em *X. tropicalis*, conforme se descreve a seguir. O método utiliza um anticorpo produzido contra a VTG de *X. tropicalis*, que se sabe funcionar também para a VTG de *X. laevis*. Note-se que também podem ser utilizados testes ELISA não competitivos, os quais podem ter limites de deteção inferiores ao método que seguidamente se descreve.

Materiais e reagentes

— Soro com o 1.º anticorpo (Ac) pré-adsorvido

— Misturar uma parte de soro contendo o 1.º anticorpo anti-VTG de *X. tropicalis* com duas partes de plasma de macho do grupo de controlo; deixar repousar à temperatura ambiente durante ~ 75 minutos, colocar em gelo durante 30 minutos, centrifugar > 20K x G durante 1 hora a 4 ºC, retirar o sobrenadante, dividir em alíquotas e armazenar a -20 ºC.

— 2.º anticorpo

— Conjugado IgG de cabra anti-coelho-peroxidase de rábano (HRP) (por exemplo, Bio-Rad 172-1019)

— VTG padrão

— VTG purificada de *X. laevis* a 3,3 mg/ml.

— TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) (por exemplo, KPL 50-76-00 ou Sigma T0440)

— Soro de cabra (NGS)(por exemplo, Chemicon® S26-100ml)

— Placas de microtitulação de 96 poços, de poliestireno EIA (por exemplo, ICN: 76-381-04, Costar: 53590, Fisher:07-200-35)

— Forno de hibridação a 37 °C (ou incubadora de ar de equilíbrio rápido) para placas; banho-maria para tubos

— Outros equipamentos, produtos químicos e materiais comuns de laboratório.

Receitas

Tampão de revestimento (50 mM de tampão de carbonatos, pH 9,6):

$NaHCO_3$	1,26 g
Na_2CO_3	0,68 g
Água	428 ml

PBS 10X (0,1 M de fosfato, 1,5 M de NaCl):

$NaH_2PO_4.H_2O$	0,83 g
$Na_2HPO_4.7\ H_2O$	20,1 g
NaCl	71 g
Água	810 ml

▼M8

Tampão de lavagem (PBST):

PBS 10X	100 ml
Água	900 ml

Ajustar o pH para 7,3 com 1 M HCl e acrescentar 0,5 ml de Tween-20

Tampão de ensaio:

Soro de cabra (NGS)	3,75 ml
Tampão de lavagem	146,25 ml

Colheita de amostras

O sangue é colhido com um tubo capilar heparinizado para micro-hematócritos e colocado sobre gelo. Após centrifugação durante 3 minutos, o tubo é marcado, aberto e o plasma expelido para tubos de microcentrífuga de 0,6 ml com 0,13 unidades de aprotinina liofilizada (estes tubos são previamente preparados por adição da quantidade adequada de aprotinina, congelação e liofilização num concentrador de vácuo a baixos níveis de calor até à secagem completa). Armazenar o plasma a -80 °C até à análise.

Procedimento para uma placa

Revestimento da placa

Misturar 20 µl de VTG purificada com 22 ml de tampão de carbonatos (concentração final: 3 µg/ml). Adicionar 200 µl a cada poço de uma placa de 96 poços. Cobrir a placa com película de selagem adesiva e deixar incubar a 37 °C, durante 2 horas (ou a 4 °C, de um dia para o outro).

Bloqueio da placa

A solução de bloqueio é preparada adicionando 2 ml de soro de cabra (NGS) a 38 ml de tampão de carbonatos. Retirar a solução de revestimento e agitar até secar. Adicionar a cada poço 350 µl da solução de bloqueio. Cobrir com película de selagem adesiva e incubar a 37 °C, durante 2 horas (ou a 4 °C de um dia para o outro).

Preparação das soluções padrão

Misturar 5,8 µl de VTG purificada-padrão com 1,5 ml de tampão de ensaio, num tubo de ensaio de vidro de borossilicato descartável de 12 x 75 mm. Obtém-se assim uma concentração de 12 760 ng/ml. Em seguida, prepara-se uma diluição em série, adicionando 750 µl da diluição anterior a 750 µl de tampão de ensaio, para produzir concentrações finais de 12 760, 6 380, 3 190, 1 595, 798, 399, 199, 100 e 50 ng/ml.

Preparação das amostras

Começar por uma diluição a 1:300 (por exemplo, misturar 1 µl de plasma com 299 µl de tampão de ensaio) ou a 1:30 do plasma em tampão de ensaio. Caso se preveja uma elevada concentração de VTG, poderão ser necessárias diluições suplementares ou de maiores quantidades. Tentar manter o valor B/B_o no intervalo-padrão. Para as amostras sem VTG apreciável – por exemplo, machos e fêmeas de controlo (todos imaturos) –, utilizar a diluição a 1:30. As amostras com diluições inferiores a esta podem apresentar efeitos de matriz indesejáveis.

Além disso, recomenda-se a análise de uma amostra de controlo positivo em cada placa. Esta amostra provém de uma mistura de plasma que contém níveis elevados de VTG induzidos. A mistura de plasma é inicialmente diluída em NGS, dividida em alíquotas e armazenada a -80 °C. Para cada placa, uma alíquota é descongelada, diluída em tampão de ensaio e analisada como uma amostra de ensaio.

▼**M8**

Incubação com o 1.º anticorpo

Preparar o 1.º Ac efetuando uma diluição a 1:2000 de soro contendo o 1.º Ac pré-adsorvido no tampão de ensaio (por exemplo, 8 µl para 16 ml de tampão de ensaio). Misturar 300 µl da solução contendo o 1.º Ac com 300 µl de amostra/ /padrão, num tubo de vidro. O tubo B_o é preparado do mesmo modo, com 300 µl de tampão de ensaio e 300 µl de anticorpo. Além disso, deve preparar-se um tubo NSB com apenas 600 µl de tampão de ensaio, ou seja, sem Ac. Cobrir os tubos com Parafilm e agitar suavemente num vórtex, para misturar. Incubar durante 1 hora em banho-maria, a 37 °C.

Lavagem da placa

Lavar a placa imediatamente antes de estar concluída a incubação do 1.º Ac. Para isso, sacudir a placa para retirar o conteúdo e secá-la com papel absorvente. Depois, encher os poços com 350 µl de solução de lavagem, esvaziar e secar. Neste caso, é útil a utilização de uma pipeta de repetição multicanais ou de um lavador de placas. Repetir mais duas vezes a lavagem, para um total de três lavagens.

Carregamento da placa

Uma vez lavada a placa, retirar os tubos do banho-maria e agitar ligeiramente num vórtex. Adicionar 200 µl de cada amostra padrão B_o e tubo NSB, para duplicar os poços da placa. Cobrir a placa com película de selagem adesiva e deixar incubar, durante 1 hora, a 37 °C.

Incubação com o 2.º anticorpo

No fim da incubação da etapa anterior, a placa deve ser novamente lavada três vezes, como descrito acima. O 2.º Ac diluído prepara-se misturando 2,5 µl do 2.º Ac com 50 ml de tampão de ensaio. Adicionar 200 µl do 2.º Ac diluído a cada poço, selar como acima indicado e incubar durante 1 hora, a 37 °C.

Adicionar um substrato

Terminada a incubação com o 2.º Ac, proceder à lavagem da placa três vezes, conforme descrito acima. Em seguida, adicionar a cada poço 100 µl de substrato TMB. Deixar reagir durante 10 minutos, de preferência ao abrigo de uma fonte de luz viva. Interromper a reação adicionando 100 µl de ácido fosfórico 1 M. A mistura irá mudar de cor, de azul para amarelo vivo. Medir a absorvância a 450 nm, utilizando um leitor de placas.

Calcular B/Bo

Subtrair o valor NSB médio de todas as medições. Calcular o valor B/B_o para cada amostra e para cada padrão, dividindo o valor da absorvância (B) pela absorvância média da amostra (B_o).

Obter a curva padrão e determinar quantidades desconhecidas

Gerar uma curva-padrão por recurso a um *software* de criação de gráficos (por exemplo, Slidewrite™ ou Sigma Plot®), que irá extrapolar a quantidade de B/B_o da amostra com base no B/B_o dos padrões. Normalmente, a quantidade é representada por pontos numa escala logarítmica e a curva apresenta uma forma sigmoide. No entanto, pode parecer linear quando se utiliza um intervalo restrito de padrões. Corrigir as quantidades de amostra de acordo com o fator de diluição e registar em mg de VTG/ml de plasma.

Determinação dos limites mínimos de deteção (LMD)

Muitas vezes, em especial no que respeita aos machos normais, não é claro como se devem registar os resultados obtidos para valores baixos. Nestes casos, devem utilizar-se «limites de confiança» de 95 % para determinar se o valor deve ser registado como zero ou como outro número. Se o resultado da amostra se situar dentro do intervalo de confiança do padrão zero (B_o), o resultado deve ser

▼M8

registado como zero. O nível mínimo de deteção será o padrão mais baixo que seja consistentemente diferente do padrão zero (ou seja, os dois intervalos de confiança não se sobrepõem). Para qualquer resultado da amostra que esteja dentro do limite de confiança do nível mínimo de deteção, ou acima, regista-se o valor calculado. Se uma amostra estiver compreendida entre o padrão zero e os intervalos de confiança do nível mínimo de deteção, deve ser registada metade do nível mínimo de deteção para o valor dessa amostra.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Olmstead AW, Korte JJ, Woodis KK, Bennett BA, Ostazeski S, Degitz SJ. 2009. Reproductive maturation of the tropical clawed frog: *Xenopus tropicalis*. General and Comparative Endocrinology 160: 117-123.

Parks LG, Cheek AO, Denslow ND, Heppell SA, McLachlan JA, LeBlanc GA, Sullivan CV. 1999. Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterisation and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 123: 113-125.

▼M8

Apêndice 7

ANÁLISE ESTATÍSTICA

O LAGDA gera três tipos de dados a analisar estatisticamente: 1) dados quantitativos contínuos; 2) dados relativos ao tempo decorrido até ao evento, no que se refere às taxas de desenvolvimento (tempo até à fase NF62); 3) dados ordinais sob a forma de índices de gravidade ou fases de desenvolvimento a partir de avaliações histopatológicas. A figura 1 ilustra a árvore de decisão para análise estatística recomendada para o LAGDA. Além disso, indicam-se a seguir algumas anotações que podem ser necessárias para efetuar a análise estatística das medições do LAGDA. Para a árvore de decisão de análise, os resultados das medições para mortalidade, crescimento (peso e comprimento) e índice hepatossomático (IHS) devem ser analisados de acordo com «Outros parâmetros».

Dados contínuos

Numa primeira fase, verifica-se se os dados relativos aos parâmetros contínuos são monótonos, transformando-os em classes e, em seguida, procedendo a uma análise de variância (ANOVA) e comparando os contrastes lineares e quadráticos. Se os dados forem monótonos, convém aplicar o teste de Jonckheere-Terpstra às medianas dos replicados, não devendo ser efetuadas quaisquer análises subsequentes. No caso de dados de distribuição normal com variâncias homogéneas, também é aplicável o teste de Williams. Se os dados não forem monótonos (o contraste quadrático é significativo e o linear não o é), convém analisá-los utilizando um modelo ANOVA com efeitos mistos. Em seguida, os dados devem ser avaliados quanto à normalidade (utilizando, de preferência, o teste de Shapiro-Wilk ou o teste de Anderson-Darling) e à homogeneidade da variância (de preferência utilizando o teste de Levene). Ambos os ensaios são realizados com os resíduos do modelo ANOVA de efeitos mistos. Embora sejam preferíveis, os testes formais de normalidade e homogeneidade da variância podem ser substituídos pelo recurso a um parecer de peritos. Se os dados apresentarem uma distribuição normal e variâncias homogéneas, as hipóteses do modelo ANOVA com efeitos mistos são verificadas e o teste de Dunnett permite determinar os efeitos significativos do tratamento. Sempre que se verifique anormalidade ou heterogeneidade da variância, os pressupostos do teste de Dunnett são violados e procura-se transformar os dados para obter a sua distribuição normal e estabilizar a variância. Se não se encontrar uma transformação deste tipo, determina-se um efeito de tratamento significativo com um teste de Dunn. Sempre que possível, deve realizar-se um teste unilateral, por oposição a um teste bilateral, mas tal exige o parecer de um perito para determinar qual o teste mais adequado para um determinado parâmetro.

Mortalidade

Os dados relativos à mortalidade devem ser analisados durante todo o ensaio e expressos em percentagem de peixes mortos num determinado viveiro. Os girinos que não tenham completado a metamorfose num dado período, os girinos que se encontrem na coorte das subamostras de larvas, as rãs juvenis selecionadas e todos os animais mortos devido a erro experimental devem ser considerados dados censurados e não devem ser incluídos no denominador do cálculo da percentagem. Antes de se proceder a qualquer análise estatística, as percentagens de mortalidade devem ser objeto de transformação do arco seno da raiz quadrada. A alternativa é utilizar o teste de Cochran-Armitage, com um eventual ajustamento de Rao-Scott em caso de sobredispersão.

Peso e comprimento (dados relativos ao crescimento)

Os machos e as fêmeas não são sexualmente dimórficos durante a metamorfose, pelo que os dados relativos ao crescimento da subamostra de larvas devem ser analisados independentemente do sexo. No entanto, os dados relativos ao crescimento dos juvenis devem ser analisados separadamente, em função do sexo genético. Pode ser necessária uma transformação logarítmica para estes parâmetros, uma vez que não é raro os dados relativos ao tamanho seguirem uma lei logarítmica normal.

▼M8

Índice hepatossomático (IHS)

Os pesos hepáticos devem ser normalizados como proporções do peso corporal total (ou seja, IHS) e analisados separadamente com base no sexo genético.

Tempo até à fase NF62

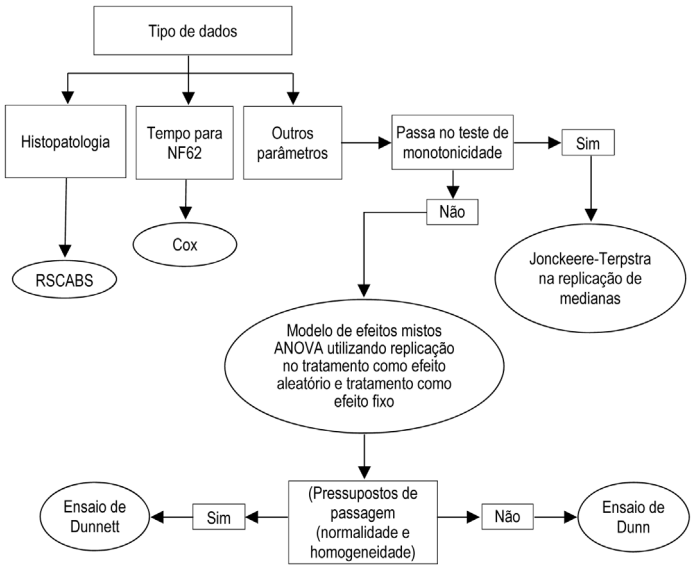
Os dados relativos ao tempo decorrido até à metamorfose devem ser tratados como dados até ao evento, sendo quaisquer mortalidades ou indivíduos que não atinjam a fase NF62 em 70 dias tratados como dados censurados à direita (ou seja, o valor verdadeiro é superior a 70 dias, embora o estudo termine antes de os animais terem atingido a fase NF62 em 70 dias). O tempo mediano até à fase NF62, que corresponde à conclusão da metamorfose nos controlos com água de diluição, deve ser utilizado para determinar a data de conclusão do ensaio. O tempo mediano até à conclusão da metamorfose pode ser determinado pelos estimadores produto-limite de Kaplan-Meier. Este parâmetro deve ser analisado por recurso a um modelo de riscos proporcionais de Cox com efeitos mistos, que tenha em conta a estrutura dos replicados do estudo.

Dados histopatológicos (índices de gravidade e fases de desenvolvimento)

Os dados histopatológicos assumem a forma de um índice da gravidade ou de fases de desenvolvimento. Um teste de tendência de Cochran-Armitage com correção do tipo Rao-Scott (RSCABS, Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices) é aplicado a cada nível de gravidade numa resposta histopatológica (Green *et al.*, 2014). A correção de Rao-Scott permite que seja tido em conta no ensaio o plano da experiência adotado para os replicados. O procedimento «by Slices» incorpora as expectativas biológicas de que a gravidade dos efeitos tende a aumentar com o aumento das doses ou concentrações, mantendo os índices dos indivíduos e indicando a gravidade dos efeitos detetados. O procedimento RSCABS não só determina quais os tratamentos que são estatisticamente diferentes dos controlos (ou seja, que têm uma patologia mais grave do que os controlos), mas também determina a que índice de gravidade a diferença ocorre, proporcionando assim o contexto tão necessário à análise. No caso da determinação da fase de desenvolvimento das gónadas e dos ductos reprodutores, convém submeter os dados a uma manipulação suplementar, uma vez que uma das hipóteses do RSCABS é que a gravidade do efeito aumenta com a dose. O efeito observado pode ser um atraso ou uma aceleração do desenvolvimento. Por conseguinte, os dados relativos à determinação da fase de desenvolvimento devem ser analisados tal como foram comunicados para detetar uma eventual aceleração do desenvolvimento e, em seguida, invertidos manualmente antes de uma segunda análise para detetar um eventual atraso no desenvolvimento.

Figura 1

Árvore de decisão para análise estatística para os dados LAGDA



▼M8

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Green JW, Springer TA, Saulnier AN, Swintek J. 2014. Statistical analysis of histopathology endpoints. Environmental Toxicology and Chemistry 33, 1108-1116.

▼M8

Apêndice 8

ELEMENTOS A TER EM CONTA PARA O ACOMPANHAMENTO E A MINIMIZAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE ESCOLIOSE

A escoliose idiopática, geralmente manifestada por uma cauda dobrada nos girinos de *Xenopus laevis*, pode complicar as observações morfológicas e comportamentais nas populações de ensaio. Devem ser envidados esforços para minimizar ou eliminar a incidência de escoliose, tanto nas populações de reserva como em condições experimentais. No ensaio definitivo, recomenda-se que a prevalência de escoliose moderada e grave seja inferior a 10 %, a fim de reforçar a confiança na capacidade do ensaio para detetar efeitos no desenvolvimento relacionados com o tratamento em larvas de anfíbios de outro modo saudáveis.

As observações diárias durante o ensaio definitivo devem registar tanto a incidência (contagem individual) como a gravidade da escoliose, quando presente. A natureza da anomalia deve ser descrita no que diz respeito à localização (por exemplo, anterior ou posterior à cloaca) e à direção da curvatura (por exemplo, lateral ou dorso-ventral). A gravidade pode ser classificada como se segue:

(NO) não observada: ausência de curvatura

(1) Mínima: ligeira curvatura lateral posterior à cloaca; apenas visível em repouso

(2) Moderada: curvatura lateral posterior à cloaca; sempre visível, mas sem inibir o movimento

(3) Grave: curvatura lateral anterior à cloaca, OU qualquer curvatura que iniba o movimento, OU qualquer curvatura dorso-ventral

Um painel científico consultivo da US EPA sobre a lei FIFRA (FIFRA SAP 2013) analisou dados recapitulativos sobre a escoliose resultantes de quinze ensaios de metamorfose de anfíbios com *X. laevis* (fase NF51 a 60+) e formulou recomendações gerais para reduzir a prevalência desta anomalia nas populações de ensaio. Estas recomendações são relevantes para o LAGDA, embora este ensaio implique um calendário de desenvolvimento mais longo.

Dados históricos relativos à desova

De um modo geral, devem utilizar-se como casais reprodutores adultos saudáveis de alta qualidade; a eliminação de casais reprodutores que produzem descendência com escoliose pode minimizar a ocorrência desta ao longo do tempo. Especificamente, pode ser benéfico minimizar a utilização de casais reprodutores capturados na natureza. O período de exposição do LAGDA começa com embriões na fase NF8-10; não é possível prever, à partida, se determinados indivíduos irão ou não apresentar escoliose. Assim, para além de acompanhar a incidência de escoliose nos animais de ensaio, devem documentar-se os dados históricos relativos às massas de ovos – incluindo a prevalência de escoliose em quaisquer larvas autorizadas a desenvolver-se. Pode ser útil monitorizar melhor a parte de cada massa de ovos não utilizada num determinado estudo e comunicar essas observações (FIFRA SAP 2013).

Qualidade da água

É importante garantir a qualidade da água, tanto nas reservas do laboratório como durante o ensaio. Para além dos critérios de qualidade da água avaliados regularmente para os ensaios de toxicidade em meio aquático, pode ser útil monitorizar e corrigir eventuais deficiências de nutrientes (por exemplo, deficiência de vitamina C, cálcio, fósforo) ou níveis excessivos de selénio e de cobre, que se sabe poderem causar escoliose em diferentes graus em *Rana* sp. de criação laboratorial e em *Xenopus* sp. (Marshall *et al.* 1980; Leibovitz *et al.* 1992; Martinez *et al.* 1992; como indicado em FIFRA SAP 2013). A utilização de um regime alimentar adequado (ver apêndice 4) e a limpeza regular dos viveiros permitem, em geral, melhorar a qualidade da água e a saúde dos espécimes de ensaio.

▼M8

Regime alimentar

O apêndice 4 contém recomendações específicas relativas ao regime alimentar, considerados eficazes no âmbito do LAGDA. Recomenda-se que as fontes de alimentos sejam analisadas para deteção de toxinas biológicas, herbicidas e outros pesticidas que se saiba causarem escoliose em *X. laevis* ou noutros animais aquáticos (Schlenk e Jenkins 2013). Por exemplo, a exposição a determinados inibidores da colinesterase foi associada à escoliose nos peixes (Schultz *et al.* 1985) e nas rãs (Bacchetta *et al.* 2008).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bacchetta, R., P. Mantecca, M. Andrioletti, C. Vismara, and G. Vailati. 2008. Axial-skeletal defects caused by carbaryl in *Xenopus laevis* embryos. Science of the Total Environment 392: 110 – 118.

Schultz, T.W., J.N. Dumont, and R.G. Epler. 1985. The embryotoxic and osteolathyrogenic effects of semicarbazide. Toxicology 36: 185-198.

Leibovitz, H.E., D.D. Culley, and J.P. Geaghan. 1982. Effects of vitamin C and sodium benzoate on survival, growth and skeletal deformities of intensively culture bullfrog larvae (*Rana catesbeiana*) reared at two pH levels. Journal of the World Aquaculture Society 13: 322-328.

Marshall, G.A., R.L. Amborski, and D.D. Culley. 1980. Calcium and pH requirements in the culture of bullfrog (*Rana catesbeiana*) larvae. Journal of the World Aquaculture Society 11: 445-453.

Martinez, I., R. Alvarez, I. Herraez, and P. Herraez. 1992. Skeletal malformations in hatchery reared *Rana perezi* tadpoles. Anatomical Records 233(2): 314-320.

Schlenk, D., and Jenkins, F. 2013. Endocrine Disruptor Screening Prog (EDSP) Tier 1 Screening Assays and Battery Performance. US EPA FIFRA SAP Minutes No. 2013-03. 21 a 23 de maio de 2013. Washington, DC.